



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Tecnologia

AMANDA ARAÚJO DA SILVA

RETARDANTES DE CHAMA ORGANOFOFORADOS EM ALIMENTOS DE
ORIGEM VEGETAL E ANIMAL: DETERMINAÇÃO ANALÍTICA E ESTIMATIVA DA
EXPOSIÇÃO HUMANA

ORGANOPHOSPHORUS FLAME RETARDANTS IN FOOD OF VEGETABLE AND
ANIMAL ORIGIN: ANALYTICAL DETERMINATION AND ESTIMATION OF HUMAN
EXPOSURE

Limeira - SP

2022

AMANDA ARAÚJO DA SILVA

RETARDANTES DE CHAMA ORGANOFOSFORADOS EM ALIMENTOS DE
ORIGEM VEGETAL E ANIMAL: DETERMINAÇÃO ANALÍTICA E ESTIMATIVA DA
EXPOSIÇÃO HUMANA

Dissertação apresentada à Faculdade de
Tecnologia da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de
Mestra em Tecnologia, na Área de
Ambiente.

Orientadora: Dra. Joyce Cristale

Coorientador: Prof. Dr. Enelton Fagnani

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA AMANDA ARAÚJO
DA SILVA, E ORIENTADA PELA DRA. JOYCE
CRISTALE.

LIMEIRA-SP

2022

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Tecnologia
Felipe de Souza Bueno - CRB 8/8577

Si38r Silva, Amanda Araújo da, 1994-
Retardantes de chama organofosforados em alimentos de origem vegetal e animal: determinação analítica e estimativa da exposição humana / Amanda Araújo da Silva. – Limeira, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: Joyce Cristale.
Coorientador: Enelton Fagnani.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Tecnologia.

1. QuEChERS, Método de. 2. Avaliação de riscos. 3. Alimentos - Contaminação. 4. GC-MS. I. Cristale, Joyce. II. Fagnani, Enelton, 1978-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Tecnologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Organophosphorus flame retardants in food of vegetable and animal origin: analytical determination and estimation of human exposure

Palavras-chave em inglês:

QuEChERS method

Risk assessment

Food contamination

GC-MS

Área de concentração: Ambiente

Titulação: Mestra em Tecnologia

Banca examinadora:

Joyce Cristale [Orientador]

Demétrio de Abreu Sousa

Patricia Prediger

Data de defesa: 07-02-2022

Programa de Pós-Graduação: Tecnologia

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-6397-4783>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/3584027173242530>

FOLHA DE APROVAÇÃO

Abaixo se apresentam os membros da comissão julgadora da sessão pública de defesa de dissertação para o Título de Mestra em Tecnologia na área de concentração de ambiente, a que submeteu a aluna Amanda Araújo da Silva, em 07 de fevereiro de 2022 na Faculdade de Tecnologia- FT/ UNICAMP, em Limeira/SP.

Dra. JOYCE CRISTALE

Presidente da Comissão Julgadora

Prof. Dr. DEMÉTRIO DE ABREU SOUSA

Instituto Federal de Mato Grosso (IFMT)

Profa. Dra. PATRICIA PREDIGER

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Ata da defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria de Pós Graduação da FT.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por iluminar meus passos, me dar calma, sabedoria e forças para concluir este trabalho.

A minha família, por me apoiar e me ajudar nos momentos que mais precisei.

Agradeço ao meu avô Benedito Araújo que também me ajudou e esteve ao meu lado, junto com a minha irmã Patrícia e meu tio Antônio.

A minha orientadora Dra. Joyce Cristale, por todo ensinamento, paciência, disponibilidade, incentivos e orientações que foram essenciais para a conclusão deste trabalho.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Enelton Fagnani por toda orientação e disponibilidade.

Ao laboratório Físico-Químico, LACAN e GOTAS, por fornecer o espaço físico para a realização da pesquisa.

Às técnicas dos laboratórios Anjaina e Josiane por toda ajuda, auxílio e disposição.

Ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia da FT-UNICAMP, pela honra de ser membro do corpo discente.

A todos os meus professores do PPGT, pelos conhecimentos adquiridos.

A todos os meus amigos de Limeira e de Minas que foram essenciais em minha jornada. Em especial a Luz e a Gabriela por toda ajuda, amizade, aprendizados e todos os momentos especiais.

Por fim, a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, e com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) - Processo número: 428135/2018-8.

RESUMO

Os retardantes de chama organofosforados (OPFRs) são utilizados na fabricação de eletrônicos, têxteis, móveis, materiais de construção e formulações químicas. Porém, estudos recentes indicam que alguns destes compostos podem causar câncer, problemas endócrinos, hormonais, problemas na reprodução, entre outros. A presença de OPFRs já foi confirmada em várias matrizes como água, poeira, solo, tecidos de animais e nos alimentos. Os alimentos podem ser contaminados por OPFRs durante o cultivo e através da cadeia alimentar, e no caso de alimentos industrializados, pelo contato com os plastificantes durante o processo de produção, empacotamento e armazenamento. O objetivo do presente estudo foi desenvolver e aplicar um método de análise para determinação de OPFRs em arroz, feijão, leite e composto lácteo a fim de estimar a exposição humana através da dieta. O método baseia-se em extração QuEChERS e análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). Foram realizados testes para estimar a recuperação dos OPFRs na matriz de leite fluido integral bovino utilizando QuEChERS tradicional e modificado. Foi feita a partição à baixa temperatura na etapa de extração, e na etapa de *clean-up* foram avaliados os cartuchos C18 e HLB, e C18 *bulk*. Por fim, foi testado o enxágue dos adsorventes PSA+C18 com acetonitrila, diclorometano e acetato de etila após a extração em fase sólida dispersiva (d-SPE). Os melhores resultados foram obtidos com o uso de C18 + PSA na etapa de d-SPE, e o uso de acetato de etila para enxágue destes adsorventes após o *clean-up*. A partir dos dados obtidos, foram realizados três diferentes curvas, sendo: a curva utilizando solvente, curva utilizando o extrato do branco de procedimento e curva utilizando o extrato da matriz (arroz, feijão, leite integral bovino e composto lácteo). Segundo os dados obtidos, as curvas preparadas utilizando o extrato da matriz apresentaram melhor performance para todas as matrizes de estudo. Por fim, foi avaliada a concentração nas amostras reais para cada alimento e foram detectados os compostos TNBP, TCIPP, TDCIPP, TPHP, TBOEP, EHDPHP e TEHP, e realizada uma estimativa preliminar da ingestão diária dos OPFRs para a população brasileira (homens e mulheres). Foi observado uma maior exposição aos compostos TPHP (35 ng/Kg/dia e 24,2 ng/Kg/dia para homens e mulheres, respectivamente) e TBOEP (55 ng/Kg/dia e 35 ng/Kg/dia para homens e mulheres, respectivamente) pelos alimentos de arroz e feijão, porém nenhum dos OPFRs excederam os valores de referência. Contudo, mais estudos são considerados necessários para uma completa avaliação da exposição humana a esses compostos através da via alimentar, incluindo maior número de amostras e outros alimentos consumidos pela população brasileira.

Palavras-chave: QuEChERS, OPEs, Avaliação de risco, Contaminantes em alimentos, GC-MS

ABSTRACT

Organophosphorus flame retardants (OPFRs) are used in the manufacture of electronics, textiles, furniture, building materials and chemical formulations. However, recent studies indicate that some of these compounds can cause cancer, endocrine and hormonal problems, reproductive problems, among others. The presence of OPFRs has already been confirmed in several matrices such as water, dust, soil, animal tissues and food. Food can be contaminated by OPFRs during cultivation and through the food chain, and in the case of processed food, through contact with plasticizers during the production, packaging and storage process. The aim of the present study was to develop and apply an analytical method for the determination of OPFRs in rice, beans, milk and dairy compounds in order to estimate human exposure through diet. The method is based on QuEChERS extraction and analysis by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). Tests were carried out to estimate the recovery in the bovine whole milk matrix using traditional and modified QuEChERS. Partition at low temperature was performed after the extraction step, and C18 cartridge, HLB cartridge, and C18 bulk were evaluated in the clean-up step. Finally, the rinsing of PSA+C18 adsorbents with acetonitrile, dichloromethane and ethyl acetate after dispersive solid phase extraction (d-SPE) was tested. The results obtained showed better results with the use of C18 + PSA in the d-SPE step, and the use of ethyl acetate to rinse these adsorbents after the clean-up. From the data obtained, three different curves were performed, namely: the curve using pure solvent, the curve using the procedural blank extract and the curve using the matrix extract (rice, beans, whole fluid bovine milk and dairy compounds). According to the data obtained, the curves prepared using the matrix extract presented better performance for all studied matrices. Finally, the concentration in real samples for each food matrix was evaluated and the compounds TNBP, TCIPP, TDCIPP, TPHP, TBOEP, EHDPHP and TEHP were detected. A preliminary estimate of the daily intake of OPFRs for the Brazilian population (men and women) was performed. A greater exposure to TPHP (35 ng/kg/day and 24.2 ng/kg/day for men and women, respectively) and TBOEP (55 ng/kg/day and 35 ng/kg/day for men and women, respectively) compounds by consumption of rice and bean was observed, but no OPFRs exceeded the reference values. However, more studies are considered necessary for a complete human exposure assessment to these compounds by diet, including a greater number of samples and other food consumed by the Brazilians.

Keywords: QuEChERS, OPEs, Risk assessment, Contaminants in food, GC-MS

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Extração QuEChERS proposta por Anastassiades et al. (2003)	23
Figura 2: Extração QuEChERS modificada e clean-up d-SPE (PSA) + SPE (C18 ou HLB) realizado em amostras de leite bovino	33
Figura 3: Maceração das amostras de arroz	35
Figura 4: Maceração das amostras de feijão	35
Figura 5: Cromatograma dos OPFRs obtido no modo SIM no GC/MS	42
Figura 6: Valores de recuperação para 9 OPFRs na extração QuEChERS tradicional de leite bovino proveniente de supermercado	43
Figura 7: Valores de recuperação de 9 OPFRs na extração de leite bovino utilizando QuEChERS modificado e diferentes e procedimentos de <i>clean-up</i> d-SPE(PSA)+C18 <i>bulk</i> ; d-SPE(PSA)+SPE(C18) e d-SPE(PSA)+SPE(HLB).	44
Figura 8: Teste com os solventes diclorometano, acetato de etila e acetonitrila para enxágue do adsorvente C18+PSA após o <i>clean-up</i>	45
Figura 9: Efeito matriz (%) obtido pra CS e CEBP em relação a curva no extrato do arroz, feijão, leite bovino e composto lácteo.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades físico-químicas de 10 retardantes de chama organofosforados (OPFRs)	16
Tabela 2: Consumo diário em g dia ⁻¹ dos alimentos arroz, feijão e leite integral no Brasil (IBGE, 2017-2018)	19
Tabela 3: Concentração média dos OPFRs em leite bovino e composto lácteo	21
Tabela 4: Tempo de retenção, íons de quantificação e íons de confirmação utilizados na detecção em modo SIM para cada OPFRs	40
Tabela 5: Equação, intervalo linear, coeficiente de determinação, limites de detecção e quantificação do método para as curvas com correspondência de matriz para arroz (ng g ⁻¹), feijão (ng g ⁻¹), leite (ng mL ⁻¹) e composto lácteo (ng g ⁻¹)	49
Tabela 6: Concentrações encontradas nas amostras de arroz, feijão, leite bovino e composto lácteo (ng/g e ng/mL)	51
Tabela 7: Estimativa da Ingestão Diária (ng/Kg/dia) dos OPFRs para a população brasileira (homens e mulheres).	55

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	12
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
2.1 HISTÓRICO E CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DOS RETARDANTES DE CHAMAS	14
2.2 RETARDANTES DE CHAMA E PLASTIFICANTES ORGANOFOBOSFORADOS	15
2.3 TOXICIDADE DOS OPFRs	18
2.4 EXPOSIÇÃO HUMANA - ESTIMATIVA DE CONSUMO DIÁRIO (EDI) DE OPFRs	18
2.4.1 ARROZ	19
2.4.2 FEIJÃO	20
2.4.3 LEITE BOVINO E COMPOSTO LÁCTEO	20
2.5 EXTRAÇÃO QuEChERS TRADICIONAL E MODIFICADA	22
2.6 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (GC-MS)	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 LOCAL DE EXECUÇÃO DO TRABALHO DE PESQUISA	28
3.2 PARTE EXPERIMENTAL	28
3.3 MATERIAIS E REAGENTES	29
3.4 LIMPEZA DOS MATERIAIS	29
3.5 PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÃO	30
3.6 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO	30
3.7 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA AMOSTRAS DE LEITE BOVINO, COMPOSTO LÁCTEO, ARROZ E FEIJÃO	34
3.7.1 RECUPERAÇÃO	36
3.7.2 CALIBRAÇÃO E LINEARIDADE	36
3.7.3 LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	37

3.7.4 EFEITO MATRIZ	38
3.7.5 TESTE t DE DADOS PAREADOS	39
3.7.6 ANÁLISE INSTRUMENTAL	39
3.8 COLETA DE AMOSTRAS	41
3.9 ESTIMATIVA DA INGESTÃO DIÁRIA DOS OPFRs VIA ALIMENTAÇÃO (EDI)	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	42
4.1 SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA E CONDIÇÕES DE DETECÇÃO	42
4.2 TESTES DE EXTRAÇÃO QuEChERS E OTIMIZAÇÃO	42
4.2.1 QuEChERS CLÁSSICO	42
4.2.2 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO QuEChERS	43
4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO	46
4.3.1 EFEITO MATRIZ	46
4.4 LINEARIDADE , RECUPERAÇÕES, LIMITES DE DETECÇÃO E DE QUANTIFICAÇÃO DO MÉTODO	48
4.5 CONCENTRAÇÃO DE OPFRs NAS AMOSTRAS	51
4.5.1 AMOSTRAS DE ORIGEM VEGETAL	52
4.5.2 AMOSTRAS DE ORIGEM ANIMAL	54
4.6 ESTIMATIVA DA INGESTÃO DIÁRIA DOS OPFRs POR MEIO DA INGESTÃO DE ALIMENTOS (EDI)	54
5. CONCLUSÃO	56
6. REFERÊNCIAS	57
7. ANEXO I	75

1. INTRODUÇÃO

Devido às preocupações cada vez maiores com relação aos efeitos da poluição na saúde humana, os ésteres organofosfatos vêm sendo utilizados como alternativas de substituição aos retardantes de chama bromados (do inglês *Brominated Flame Retardants*, BFRs), como os éteres difenílicos polibromados (PBDEs) e o hexabromociclododecano (HBCDD) (TRABALÓN et al., 2017). Os PBDEs foram eliminados do mercado de forma gradual ao serem listados como poluentes orgânicos persistentes (POPs) (UNEP, 2017). Como consequência, para substituir os PBDEs, houve um aumento na utilização dos retardantes de chama organofosforados (do inglês, *Organophosphate Flame Retardants*, OPFRs) para substituir os PBDEs (IQBAL, 2017).

Os OPFRs são utilizados como retardantes de chama em uma variedade de produtos, como plásticos, têxteis, móveis, eletrônicos, na construção civil e produtos domésticos (MARKLUND et al., 2003). Estes compostos são também utilizados como plastificantes e agentes antiespumante (VAN DER VEEN; DE BOER, 2012). Em razão das vantagens que os OPFRs oferecem por suas características físico-químicas, que serão descritas nesta dissertação, o seu consumo global teve um aumento de 680.000 toneladas em 2015 (WANG et al., 2019). Porém, geralmente os OPFRs não são ligados quimicamente aos produtos, sendo liberados para o ambiente por meio de fenômenos físicos como volatilização, lixiviação e/ou abrasão (CAO et al., 2013). Devido à exposição humana a OPFRs, estudos vêm avaliando os riscos à saúde humana decorrentes desta exposição. Alguns desses estudos apontam potenciais problemas no sistema imunológico, neurológico, endócrino, reprodutivos e fator de risco para câncer (CHUPEAU et al., 2021; BEKELE et al., 2021).

Assim, os OPFRs já foram encontrados em diversas matrizes ambientais como sedimentos (LEE et al., 2018), água (CRISTALE et al., 2013; LAI et al., 2019), ar (GRAVEL et al., 2019), poeira (HOFFMAN et al., 2015), solos (WAN et al., 2016), além de tecidos humanos (LI et al., 2019) e alimentos (POMA et al., 2017; POMA et al., 2018, ZHANG et al., 2020). Os alimentos podem ser contaminados por meio da cadeia alimentar (ZHANG et al., 2016) e durante o processamento e armazenamento ao ter contato com os OPFRs (POMA et al., 2018).

Estes estudos são importantes pois demonstram a urgência em avaliar a presença de OPFRs em alimentos, sobretudo os mais consumidos, já que a ingestão alimentar é uma das vias de exposição a OPFRs (POMA et al., 2017).

No Brasil, o arroz é um dos alimentos mais consumidos no país (76,1% de consumo em relação a outros alimentos) (IBGE, 2017-2018). Não apenas no Brasil, o arroz faz parte da alimentação básica e da nutrição de milhões de pessoas no mundo (SCHMIDT, 2015; ZHANG et al., 2010). Além do arroz, o feijão também é um dos alimentos mais consumidos no Brasil, equivalente a 60% (IBGE, 2017-2018). Quanto ao consumo de leite no Brasil, em 2017, o brasileiro consumiu 175 kg de leite correspondente a 480 g/hab/dia, ou 2 porções diárias de leite/pessoa/dia (SIQUEIRA, 2019). Em 2018, teve um faturamento de R\$ 68,7 bilhões, sendo o segundo segmento mais importante da indústria de alimentos brasileira, estando atrás do setor de derivados da carne (SIQUEIRA, 2019). Há uma estimativa que em 2025 o Brasil produzirá 47,5 milhões de toneladas de leite (VILELA et al., 2017).

Alguns estudos já determinaram a presença de OPFRs em arroz obtidos diretamente do cultivo, e no estudo de Zhang et al. (2016) observaram uma média de 69,9 ng g⁻¹. Assim como o arroz, também já foi determinado a presença de OPFRs em leite (ZHAO et al., 2019; POMA et al., 2018; DING et al., 2018; WU et al., 2017). Poma et al. (2018) encontraram uma concentração média de 0,51 ng g⁻¹ de OPFRs em leite bovino enquanto que, para o mesmo tipo de analito e matriz, Zhao et al. (2019) encontraram uma concentração média de 1,51 ng g⁻¹. Porém, não foram encontrados estudos que determinaram a presença dos OPFRs em feijão. No Brasil, não há dados sobre a presença destes compostos nestes alimentos, fato que motivou este estudo a desenvolver um método analítico e gerar dados sobre a exposição humana a OPFRs.

OBJETIVO GERAL

Desenvolver um método analítico para a determinação de OPFRs em alimentos de origem vegetal e animal de elevado consumo no Brasil, e avaliar a exposição humana a estes compostos através do consumo alimentar.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar um método baseado em QuEChERS para a determinação de OPFRs em arroz, feijão, leite líquido integral bovino e composto lácteo utilizando Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS);
- Determinar a concentração de OPFRs nas matrizes de estudo;
- Estimar os valores de ingestão diária dos OPFRs para mulheres e homens.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 HISTÓRICO E CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DOS RETARDANTES DE CHAMAS

Os retardantes de chama têm por finalidade retardar ou inibir a chama no processo de queima dos materiais (MARTINS et al., 2013). Essa prática é antiga e vem sendo utilizada desde 450 a.C pelos egípcios para reduzir a inflamabilidade da madeira e também por romanos em 200 a.C que utilizavam alume e vinagre para a mesma finalidade (WHO, 1997). Devido ao grande uso de materiais poliméricos inflamáveis, há uma ampla utilização dos retardantes de chama (PESTANA, 2008).

Na década de 1990, já existiam mais de 175 produtos para retardar a chama, sendo classificados em grandes grupos como: inorgânicos (hidróxidos de alumínio, antimônio e estanho), orgânicos halogenados (clorados e bromados) e organofosforados (WHO, 1997).

Os retardantes de chama halogenados são à base de clorados e bromados e representam em 31% da produção mundial (PIERONI et al., 2017). A eficiência do retardante de chama halogenado varia com o halogênio, sendo que o bromo é mais eficaz que o cloro por possuir ligações mais fracas com o carbono, permitindo interferir em um ponto mais favorável no processo de combustão (LAOUTID et al., 2009; SINGH; JAIN, 2008). Sendo muito utilizados o tris (1,3-dicloro-2-propil) fosfato (TDCIPP), (2-cloroetil) fosfato (TCEP); tris (1-cloro-2-propil) fosfato (TCIPP) (BAYEN et al., 2006).

Os PBDEs foram retirados do mercado em meados de 2000 depois de sua inclusão na lista de Poluentes Orgânicos Persistentes da Convenção de Estocolmo (POPs) (FROMME et al., 2015; UNEP, 2017). Os OPFRs têm sido utilizados como substitutos dos PBDEs em diversas aplicações (IQBAL, 2017).

Os retardantes de chama organofosforados se dividem em três principais grupos, sendo eles: inorgânicos, orgânicos e halogenados. Os inorgânicos são comumente utilizados como fósforo vermelho e amônio-polifosfato; os orgânicos possuem em sua estrutura molecular grupos ésteres, fosfonatos ou fosfinatos; e os halogenados, que possuem principalmente cloro ou bromo e componentes fosforados na molécula (VAN DER VEEN; DE BOER, 2012).

2.2 RETARDANTES DE CHAMA E PLASTIFICANTES ORGANOFOSFORADOS

Os OPFRs são usados em diversas aplicações, como TCIPP, TDCIPP e TCEP, em espumas de poliuretano para retardar a chama. O tris (2-butoxietil) fosfato (TBOEP), trifenil fosfato (TPHP), 2-etilhexil difenil fosfato (EHDPHP), TDCIPP, trimetil fenil fosfato (TMPP), tributil fosfatos (iso- (TIBP) e n-isômero (TNBP)) e TBOEP são usados como plastificantes, lubrificantes, em concretos, de forma predominante (MEYER; BESTER, 2004; ANDRESEN et al., 2004; VAN DER VEEN; BOER, 2012; WEI et al., 2015). As informações de Coeficientes de Partição Octanol-água (LogKow), solubilidade em água e a fórmula molecular sobre os OPFRs estão descritas na Tabela 1.

Os OPFRs têm diversas propriedades físicas e químicas, e abrangem uma ampla faixa de polaridade. O Log Kow indicam o potencial de bioacumulação do composto (PANTELAKI; VOUTSA, 2019).

Foi relatado que os valores de Log Kow estão associadas à letalidade e toxicidade no desenvolvimento em embriões de peixe-zebra (DISHAW et al., 2014). Os OPFRs possuem uma boa solubilidade em água e por isso são relatados como contaminante onipresentes, consequentemente se acumulam facilmente no arroz e vegetais através da água e do solo (ZHANG et al., 2016).

Os OPFRs são adicionados aos materiais poliméricos por meio de mistura física e não são ligados quimicamente, por isso eles são liberados para o meio ambiente por volatilização, lixiviação, abrasão e dissolução durante o seu ciclo de vida (PANG et al., 2017).

Tabela 1: Propriedades físico-químicas de 10 OPFRs.

	Composto	Nome do composto	Log Kow	Solubilidade em Água (mg L ⁻¹) a 25°C	Fórmula molecular
Alquil-OPFRs	TiBP	tributil fosfato	3,5	475,57	C ₁₂ H ₂₇ O ₄ P
	TnBP	tris(butil)fosfato	3,82	280	C ₁₂ H ₂₇ O ₄ P
	TEHP	tris (2-ethylhexil) fosfato	9,49	0,6	C ₂₄ H ₅₁ O ₄ P
Aril-OPFRs	TPhP	tris(fenil) fosfato	4,7	1,9	C ₁₈ H ₁₅ O ₄ P
	TMPP	trimetil fenil fosfato	6,34	0,1	C ₂₁ H ₂₁ O ₄ P
Cloroalquil-OPFRs	TCEP	(2-cloroetil) fosfato	1,63	7000	C ₆ H ₁₂ Cl ₃ O ₄ P
	TCIPP	tris (1-cloro-2-propil) fosfato	2,89	51,85	C ₉ H ₁₈ Cl ₃ O ₄ P
	TDCIPP	tris (1,3-dicloro-2-propil) fosfato	3,65	7	C ₉ H ₁₅ Cl ₆ O ₄ P
Híbridos-OPFRs	TBOEP	tris (2-butoxietil) fosfato	3,00	1100,00	C ₁₈ H ₃₉ O ₇ P
	EHDPP	2-ethylhexil difenil fosfato	6,30	1,90	C ₂₀ H ₂₇ O ₄ P

Fonte: Greaves et al. (2016); Van Der Veen; de Boer (2012).

O mecanismo de ação retardante de chama dos OPFRs baseia-se na formação de radicais livres ativos ($\text{PO}_2 \cdot$; $\text{PO}\cdot$ e $\text{HPO}\cdot$) que captam os radicais $\text{H}\cdot$ e $\text{OH}\cdot$ e catalisam a recombinação de átomo de H nas moléculas de H_2 (SCHARTEL, 2010).

Muitos desses retardantes de chama são encontrados em níveis relativamente altos em ambientes internos, externos, e em humanos (MITRO et al., 2016), pois são expostos a esses produtos químicos diariamente podendo causar riscos à saúde (BAJARD et al., 2019).

Estudos atuais já demonstram a presença de OPFRs em vários compartimentos ambientais, como ar, água superficial, poeira, alimentos, sedimentos e solo (CHEN et al., 2019; CRISTALE et al., 2020; GIULIVO et al., 2017; WANG; KANNAN, 2018; LEE et al., 2018; LI et al., 2014; PERSSON et al., 2018; SHA et al., 2018; WANG et al., 2018; YADAV et al., 2019; ZHA et al., 2018). Em alimentos já foram encontradas em peixes / frutos do mar, carnes, laticínios, gorduras, óleos, grãos, arroz, queijo, cereais, açúcar / doces, vegetais e bebidas (DING et al., 2018; HE et al., 2018; POMA et al., 2018; WANG; KANNAN, 2018; ZHANG et al., 2016).

Na China, foi relatado concentrações médias de OPFRs mais altas em alimentos processados do que em alimentos não processados (ZHAO et al., 2019). Embora muitos alimentos, como carne, cereais e leite, podem ser contaminados durante as etapas de produção ou armazenamento e alimentos como peixes, que geralmente são consumidos frescos, podem bioacumular OPFRs por meio da dieta ou via membranas branquiais (LI et al., 2019).

Além das amostras ambientais, foram detectados em cabelos humanos, unhas, urina e leite materno (HE et al., 2018; LIU et al., 2016; SUNDKVIST et al., 2010), sendo as vias de exposição humana a OPFRs a respiração, ingestão de poeira, absorção dérmica e ingestão de alimentos (POMA et al., 2017).

Apesar dos benefícios dos OPFRs em evitar incêndios, a Agência de Proteção Ambiental Estadunidense (EPA) alerta sobre os malefícios à saúde humana e dos animais, devido ao uso de forma ampla desses retardantes de chama em produtos eletrônicos, veículos e espumas de poliuretano, pois alguns destes compostos são persistente no meio ambiente (US EPA, 2016), e foram caracterizados como contaminante ambiental de interesse emergente (IQBAL et al., 2017).

2.3 TOXICIDADE DOS OPFRs

Estudos vêm constatando efeitos adversos à saúde humana incluindo carcinogenicidade, genotoxicidade, cardiotoxicidade, dermatites e problemas de reprodução (WEI et al., 2015; SHEN et al., 2019; MCGEE et al., 2013; LI et al., 2015). De modo específico, quanto aos distúrbios associados à exposição ao TCEP incluem-se citotoxicidade (TA et al., 2014), neurotoxicidade (MOSER et al., 2015) e aumento do risco de câncer na tireoide (MUGHAL; DEMENEIX, 2017).

Vários estudos mostraram que o TPHP provoca efeitos tóxicos no desenvolvimento embrionário (DU et al., 2015; ISALES et al., 2015), metabolismo de lipídios (DU et al., 2016), problemas tireoidianos (LIU et al., 2013; KIM et al., 2015) e neurotoxicidade (JAREMA et al., 2015). Quanto à neurotoxicidade, foi constatado que o TNBP induz problemas neurológicos em larvas de peixe-zebra (SUN et al., 2016).

An et al. (2016) utilizaram altas concentrações de TPHP, TBOEP e TCIPP e constaram que esses OPFRs induzem toxicidade celular em várias linhagens celulares, enquanto que WANG et al. (2015) descobriram que larvas fêmeas de peixe-zebra expostas a TDCIPP até a idade adulta reduziram os níveis de dopamina e serotonina.

Quanto ao EHDPHP, Schang et al. (2016) constatarem problemas endócrinos em camundongos, sendo que pode alterar os níveis de hormônio tiroxina (T4) produzido na tireóide (PRESTON et al., 2017) e no estudo de Behl et al. (2015) constaram efeitos neurotóxicos em ensaios *in vitro*. Portanto, devido a esses problemas constatados em diversos estudos, torna-se necessário estar atento aos efeitos adversos à saúde e ao nível de exposição humana (CHEN et al., 2018).

2.4 EXPOSIÇÃO HUMANA - ESTIMATIVA DIÁRIA DE INGESTÃO (EDI) DE OPFRs

Para estimar o consumo diário de OPFRs por meio da ingestão alimentar, autores como Wang et al. (2018), Liu et al. (2019), Zhao et al. (2019), Zhang et al. (2016) e Ding et al. (2018) têm feito a estimativa diária de ingestão dos OPFRs (EDI) relacionando: o peso corporal da população humana (local onde o estudo é realizado), a concentração de OPFRs determinada nos alimentos e o consumo per capita diário do alimento de estudo, baseado na Equação 1:

Equação 1:

$$EDI = \sum_{i=1}^{n_i} \frac{Ci \times CFi}{BW}$$

Sendo que,

Ci: Concentração média dos OPFRs encontrados nos alimentos;

CFi: Consumo per capita diário dos alimentos correspondente em g dia⁻¹;

BW: Peso corporal médio em Kg da população correspondente.

Partindo desses cálculos, quando determinadas as concentrações de OPFRs nesses alimentos, é possível estimar a ingestão desses compostos por meio da ingestão diária dos alimentos considerando uma média de 60 Kg (IBGE, 2017-2018) para a população brasileira. No Brasil, a média em g do consumo diário de arroz, feijão e leite bovino segundo o IBGE (2017-2018) está mostrado na Tabela 2.

Tabela 2: Consumo diário em g dia⁻¹ dos alimentos arroz, feijão e leite integral no Brasil (IBGE, 2017-2018).

ALIMENTOS	MULHERES	HOMENS
ARROZ	107,7	157,1
FEIJÃO	112,0	175,0
LEITE INTEGRAL	16,3	16,7

2.4.1 ARROZ

O arroz é uma gramínea semi-aquática anual e inclui 22 espécies conhecidas, no qual apenas duas espécies são importantes para o consumo humano. As duas

espécies que são de consumo humano incluem o *Oryza sativa* e *Oryza glaberrima* (WANG et al., 2006). O *O. sativa* é o mais amplamente cultivado na Ásia, América do Norte e do Sul, União Europeia, Oriente Médio e África. Enquanto que o *O. glaberrima* é mais cultivado na África (MUTHAYYA et al., 2014).

O Brasil ocupa o 10º lugar de maior produtor de arroz no mundo com uma média total de produção de 12 milhões de toneladas, tendo maior produção nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (FAO, 2018). Esse alimento foi considerado uma das principais via de exposição dos OPFRs para os seres humanos (ZHANG et al., 2016). Foi encontrada uma concentração relativamente alta de OPFRs no arroz em um estudo de Zhang et al. (2016), com 7,59 a 55,9 ng g⁻¹. Os mesmos autores ressaltaram que o arroz e outras plantas podem absorver e acumular esses contaminantes pelo solo. No estudo de Poma et al. (2018) também foi encontrado uma média de 13,01 ng g⁻¹. O arroz da China teve os maiores níveis de TCEP com média de 29,8 ng g⁻¹, EHDPHP com média de 4,17 ng g⁻¹, TPHP com média de 26,14 ng/g⁻¹, TCIPP com média de 0,87 ng g⁻¹ e TNBP com média de 0,55 ng g⁻¹ (LI et al., 2019).

2.4.2 FEIJÃO

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma das leguminosas mais importantes em todo o mundo (REICHERT et al., 2020; MEJIA et al., 1999). No Brasil, o feijão é de grande importância para a agricultura e na dieta da população, além disso o país é um dos maiores produtores e consumidores do mundo (BARBOSA et al., 2010).

Porém, não foram relatados estudos que determinaram a presença de OPFRs em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e se torna necessário desenvolver metodologias para avaliar a exposição humana a OPFRs por meio da ingestão de feijão, já que é um dos alimentos mais consumidos no Brasil.

2.4.3 LEITE BOVINO E COMPOSTO LÁCTEO

O leite também tem um papel importante na nutrição humana. Esse alimento é altamente recomendado em todo o mundo como parte de uma dieta saudável, pois possui proteínas, vitaminas e minerais (SARODE et al., 2016).

A indústria de laticínios vem crescendo nos últimos anos, com uma grande variedade de produtos (KANZA et al., 2017), como o composto lácteo. O composto lácteo é basicamente composto por leite de vaca desnatado, óleos, vegetais e açúcares (ROMO-PALAFOX et al., 2020).

O leite é uma matriz complexa devido à presença de carboidratos, proteínas e gorduras. Por esse fato a preparação de amostra para determinação de OPFRs envolve etapas de extração (GUO et al., 2016). Existem vários estudos que têm buscado melhores metodologias para a determinação dos OPFRs em leite e composto lácteo (WU et al., 2017). É conhecido que o leite é uma das fontes mais importante para a alimentação das pessoas, e esses estudos são de suma importância para avaliar a presença de contaminantes e auxiliar em políticas governamentais (GUO et al., 2016).

Até agora, ainda há poucos estudos que determinaram a presença de OPFRs em leite líquido e composto lácteo, e a Tabela 3 apresenta os níveis encontrados em alguns estudos.

Tabela 3: Concentração média dos OPFRs em leite líquido bovino e composto lácteo

AMOSTRAS	OPFRs	CONCENTRAÇÃO (MÉDIA)	REFERÊNCIAS
LEITE LÍQUIDO BOVINO	EHDPHP, TEP (trietil fosfato), TCEP, TCIPP, TPHP, TEHP (tris (2- etilhexil) fosfato), TNBP, TBOEP, TMPP, TPrP, TDCIPP	1,70 ng/g ⁻¹	ZHAO et al. (2019)
LEITE LÍQUIDO BOVINO	TNBP, TCEP, TCIPP, TPHP, TEHP, TDCIPP, EHDPHP	0,51 ng/g ⁻¹	POMA et al. (2018)

LEITE LÍQUIDO BOVINO	TEP, TCEP, TCIPP, TDCIPP, TPHP, TNBP, TBOEP, TMPP, TEHP	0,2 ng/g ⁻¹	DING et al. (2018)
LEITE LÍQUIDO BOVINO	TMPP, TEP, TBOEP, TCEP, TCIPP, TBEP	nd*	WU et al. (2017)
COMPOSTO LÁCTEO	TEP	0,6 ng/g ⁻¹	

nd* não detectados

2.5 EXTRAÇÃO QuEChERS TRADICIONAL E MODIFICADA

A extração QuEChERS (Rápido, fácil, barato, eficaz, robusto, seguro – do inglês *Fast, Easy, Cheap, Effective, Robust, Safe*) foi proposta por Anastassiades et al. (2003) para a extração de resíduos de pesticidas em frutas e vegetais e está esquematizada na Figura 1. O objetivo do desenvolvimento da extração QuEChERS no estudo dos autores foi estabelecer uma análise multirresíduos de pesticidas, rápido e barato que apresente resultados de alta qualidade analítica durante a extração e purificação, com poucas etapas analíticas e pequenas quantidades de reagentes, sem prejudicar os valores de recuperação para qualquer analito de estudo.

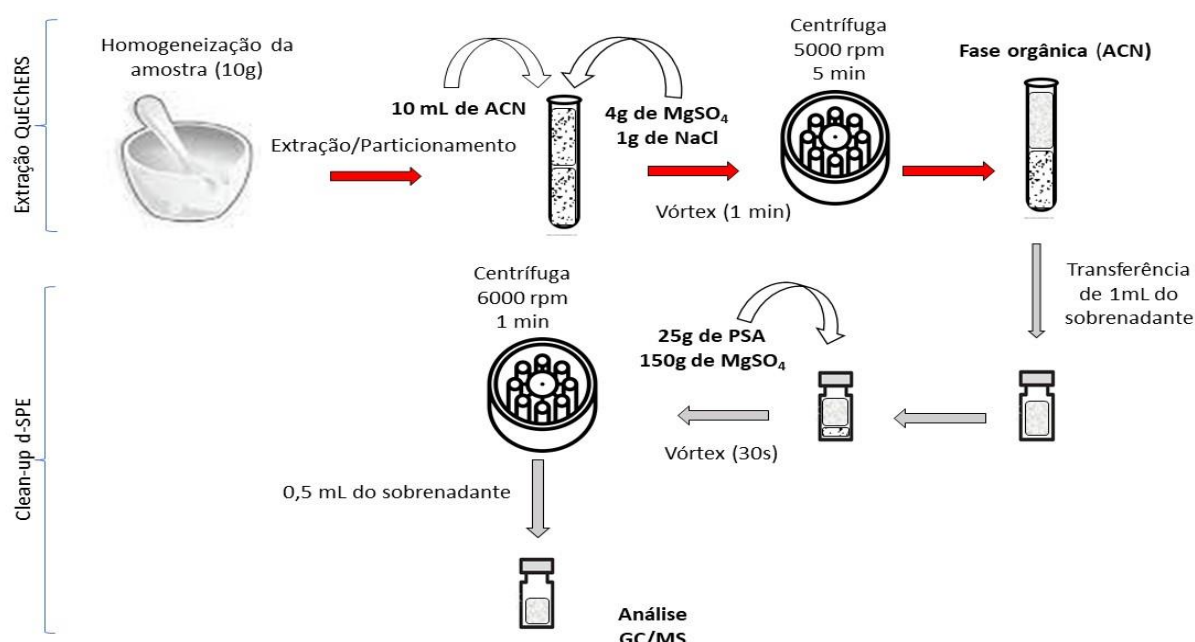


Figura 1: Extração QuEChERS proposta por Anastassiades et al. (2003) Fonte: Autoria própria

A preparação da amostra é uma etapa crucial em qualquer procedimento analítico. O objetivo desta etapa é obter a recuperação adequada para um número importante de analitos em diferentes matrizes com extratos livres de excesso de coextrativos. As tendências atuais da Química Analítica envolve mover-se em direção a protocolos simples, rápidos, econômicos e de alto rendimento sem comprometer a reprodutibilidade, representatividade, exatidão, precisão, seletividade, sensibilidade e detectabilidade (GALUSZKA et al., 2013).

Desde a criação do QuEChERS foram realizadas diversas modificações de acordo com a natureza química do analito e tipo de matriz, que incluem a otimização e combinação de solventes e sais. Portanto, para que a extração QuEChERS seja desenvolvida com sucesso é importante levar em consideração o tamanho da amostra, escolha do solvente de extração, diferentes formas de agitação, a separação de fases e *clean-up* (PRESTES et al., 2009).

O tamanho da amostra é um fator muito importante na extração. As amostras sólidas devem ser trituradas ao menor tamanho de partícula possível, e recomenda-se utilizar 10g por amostra (LEHOTAY; ZWEIGENBAUM, 2011; KIM et al., 2019), o que também foi proposto inicialmente por Anastassiades et al. (2003). No entanto, os autores WU et al. (2017) utilizaram 6g de amostras na extração QuEChERS para a

determinação de OPFRs em amostras de leite e composto lácteo, em amostras de feijão para a determinação de pesticidas foi utilizado 5g da amostra moída para a análise de pesticidas (REICHERT, 2020).

Na extração QuEChERS modificada, geralmente os solventes mais utilizados para extração são: acetato de etila, acetona e acetonitrila, que apresentam suas respectivas vantagens e desvantagens. O acetato de etila tem sido considerado um solvente universal pois possui boas porcentagens de recuperação nos ensaios com pesticidas (PIHLSTROM et al., 2007). Esse solvente é usado comumente em análises MRMs – Método Multirresíduo (capacidade de determinar de forma simultânea mais de um resíduo em uma única análise, do inglês - *multiresidue method*), pois tem vantagens de ser imiscível de forma parcial com água e por isso não é necessário a utilização de outros solventes apolares para a separação da água do extrato (HOLSTEGE et al., 1994).

A acetona e a acetonitrila, miscíveis em água em temperatura ambiente, podem extrair os analitos em uma fase única na matriz. Com o solvente acetona é necessário adicionar solvente apolar para a separação entre a fase orgânica e aquosa, sendo que para a acetonitrila não é necessário (MASTOVSKÁ; LEHOTAY, 2004).

O QuEChERS geralmente utilizam $MgSO_4$ e NaCl para a separação das fases orgânicas (geralmente acetonitrila) da fase aquosa e para reter água. Além desse, também se usa o cloreto de magnésio, nitrato de sódio, sulfato de sódio e cloreto de lítio (KIM et al., 2019).

Para que o estudo seja eficiente, é necessário realizar o *clean-up* para evitar que compostos não-voláteis da matriz fiquem aderidos no injetor e coluna, podendo alterar a resposta do sistema cromatográfico (UENO et al., 2004). Geralmente, a extração QuEChERS é associada a uma etapa de *clean-up* em fase sólida dispersiva (d-SPE) para remover componentes polares e água da matriz. A extração d-SPE tem por objetivo obter um extrato final com menor quantidade de interferentes sendo um método versátil, uma vez que permite diferentes misturas e quantidade de solventes, dependendo do tipo de matriz e do analito alvo (ANASTASSIADES et al., 2003).

Para que uma análise seja eficiente é preciso realizar modificações em relação ao analito e tipo de matriz alimentar. GUO et al. (2016) realizaram uma extração QuEChERS modificada para a determinação de OPFRs com sorbentes C_{18} , PSA e GCB (do inglês - *graphitized carbon black*) para o composto lácteo, por ser uma matriz

seca com grande quantidades de proteínas e ácidos graxos no qual os valores de recuperação variaram de 70% a 120%. Além disso, LIU et al. (2018) congelaram os lipídios depois da extração combinado com as etapas de SPE, pois segundo os autores esse processo economiza solventes orgânicos e fornece resultados satisfatórios. A partição a baixa temperatura, pode eliminar uma grande quantidade de lipídio presente na matriz, pois o mesmo fica congelado e assim facilita a retirada do sobrenadante sem risco de coletar a gordura (LIU et al., 2018).

2.6 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (GC-MS)

A cromatografia gasosa é uma técnica amplamente utilizada para análises quantitativas e qualitativas de misturas, para a purificação de compostos e para a determinação de constantes termoquímicas como calores de solução e vaporização, pressão de vapor e coeficientes de atividade (NASCIMENTO et al., 2018).

Esta técnica utiliza uma fase móvel que é um gás e uma fase estacionária que pode ser sólida (cromatografia gás-sólido) ou líquido (cromatografia gás-líquido), e os instrumentos analíticos são compostos por um sistema de introdução do gás de arraste, controladores de fluxo, sistema amostrador-injetor, coluna, forno, detector e sistema de aquisição de dados (NASCIMENTO et al., 2018). Além disso, a cromatografia consiste em transportar a amostra através do gás de arraste sem que seja alterada a sua estrutura, para isso o gás deve ter alta pureza, ser inerte e que se adeque ao detector, sendo que os mais utilizados são os gases He, N₂ e H₂ (NASCIMENTO et al., 2018). Na cromatografia gasosa é possível detectar os compostos por meio do tempo de retenção dos mesmos, ou seja, o tempo em que o composto, desde o momento da injeção, obteve o pico máximo, o qual é característico de cada soluto (NASCIMENTO et al., 2018).

Os principais detectores utilizados são os detectores de ionização em chama, detector de captura de elétrons, detector de nitrogênio-fósforo, detector de condutividade térmica, detector fotométrico de chama, detector de fotoionização e a espectrometria de massas (NASCIMENTO et al., 2018).

Para a determinação de contaminantes orgânicos em alimentos, geralmente a cromatografia gasosa é acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) pois é um

detector universal e útil em analisar uma diversidade maior de compostos (NASCIMENTO et al., 2018). O GC-MS é utilizado para identificar compostos e determinar suas concentrações em amostras, e o desenvolvimento do método analítico deve atender a dois critérios: (I) Determinar corretamente o espectro de massas dos compostos individuais para identificação e; (II) calcular com precisão os picos cromatográficos correspondentes aos compostos em cada amostra (JOHNSEN et al., 2017).

A cromatografia é sensível e eficiente na separação de componentes de misturas, por isso a cromatografia gasosa é uma das ferramentas mais importantes da química (MARSTON, 2007). Quanto ao espectrômetro de massas, tem uma ampla aplicação em estudos de análises de contaminantes em matrizes ambientais e alimentícias por meio de métodos multirresíduos que demandam técnicas de alta sensibilidade e seletividade para análises quantitativas e qualitativas. Para isso, a confirmação do composto por meio do espectro é de suma importância para que evite a presença de falso-positivo (SOUSA et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2018).

No desenvolvimento do método cromatográficos de análise é importante realizar a análise de recuperação dos analitos na amostra alvo, que fornece resultados sobre a eficiência do método de preparo da amostra, e pode ser estimado pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas de analito. Além da recuperação, é preciso avaliar o efeito matriz, pois o mesmo pode induzir um aumento ou diminuição da resposta cromatográfica e pode trazer erros durante as análises, podendo afetar também a sensibilidade e a precisão dos resultados (HAJSLOVÁ et al., 1998). O efeito matriz pode gerar uma porcentagem de recuperação superior a 100% levando à superestimação do resultado, e em outros casos pode causar mascaramento do pico do analito alvo, gerando um resultado falso-negativo, causando erro na identificação do analito (HAJSLOVÁ et al., 1998; SALVADOR et al., 2006; HAJSLOVÁ ET AL., 2003).

Em amostras complexas como de origem animal e vegetal o efeito matriz nas análises cromatográficas é mais pronunciado devido à presença de carboidratos, proteínas, pigmentos, etc., que podem permanecer solubilizados nos extratos mesmo após a purificação da amostra (HAJSLOVÁ et al., 2003). Além do tipo de matriz, outros fatores também influenciam no efeito matriz, como as condições cromatográficas, os tipos de componentes do injetor, coluna cromatográfica e detector (ERNEY e

al.,1993). Para amenizar o efeito matriz alguns procedimentos são empregados, como a curva analítica com correspondência da matriz, analitos protetores, configuração das formas de injeção, limpeza dos extratos e método de adição de padrão (PINHO et al., 2009).

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) também são parâmetros importantes, pois avaliam a menor quantidade de analito na amostra que pode ser detectado em um procedimento analítico (LD) (NATA, 2013) e a menor quantidade que pode ser quantificado em um procedimento analítico, com precisão e exatidão aceitáveis (ICH, 2005). É possível analisar o LD e LQ por meio da avaliação/percepção visual, relação sinal/ruído, baseado em parâmetros da curva analítica, desvio padrão do branco e curva do desvio padrão. A relação sinal ruído pode ser determinada pela comparação dos sinais do pico e do ruído, na menor concentração detectada. É considerado aceitável, uma relação sinal ruído de 3:1 ou 2:1 para estimar os LQ e LD. Enquanto que o desvio padrão do branco, para determinar o LD, pode ser estimada pela Equação 2 (INMETRO, 2020):

Equação 2

$$LD = \bar{X} + 3.s$$

Onde:

$\bar{X}$ = média dos valores dos brancos da amostra;

s = desvio padrão amostral dos brancos da amostra.

E o LQ pode ser estimada pela Equação 3 (INMETRO, 2020):

Equação 3

$$LQ = \bar{X} + 10.s$$

Onde:

$\bar{X}$ = média dos valores dos brancos da amostra;

s = desvio padrão amostral dos brancos da amostra.

A precisão é usualmente determinada pelo desvio padrão e desvio padrão relativo da resposta analítica e pode ser calculado através da seguinte Equação 4 (INMETRO, 2020):

Equação 4

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

DPR: Desvio padrão relativo

DP: Desvio padrão

CMD: Concentração média determinada

Enquanto que a exatidão pode ser estimada por meio do cálculo da recuperação (R) através da Equação 5 (INMETRO, 2020):

Equação 5

$$REC: \frac{x_{lab}}{x_v} \times 100$$

onde:

x_{lab}: valor obtido ou média aritmética de valores obtidos experimentalmente

x_v: valor admitido como verdadeiro/esperado

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE EXECUÇÃO DO TRABALHO DE PESQUISA

A pesquisa foi realizada no Laboratório do Grupo de Otimização de Tecnologias Analíticas Aplicadas a Amostras Ambientais e Sanitárias (GOTAS), Laboratório Central Analítica (LACAN) e Laboratório Físico-Químico, da Faculdade de Tecnologia da UNICAMP.

3.2 PARTE EXPERIMENTAL

Os procedimentos experimentais foram realizados na seguinte ordem: 1- preparo de soluções padrão; 2- testes preliminares da extração QuEChERS tradicional; 3- modificações para otimização do método QuEChERS; 4- Validação do método; 5- coleta e análise de amostras de leite integral bovino, composto lácteo , arroz e feijão; 6- cálculo da ingestão diária de OPFRs pelo consumo dos alimentos estudados.

3.3 MATERIAIS E REAGENTES

Foram escolhidos os compostos tributil fosfato (TIBP), tris (2-cloro-2-etil) fosfato (TCEP), tris (2-cloroisopropil) fosfato (TCIPP), tris (1,3-dicloroisopropil) fosfato (TDCIPP), tris(fenil) fosfato (TPHP), tris(butil)fosfato (TNBP), tris(2-butoxietil) fosfato (TBOEP), 2- etilexil difenil fosfato (EHDPHP), tris (2-etilhexil) fosfato (TEHP) e tris (metilfenil) fosfato (TMPP) adquiridos de Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany) e trifenil fosfato D15 (TPHP-D15) e tributil fosfato-D27 (TNBP-D27) adquiridos em Cambridge Isotope Laboratories (Andover, USA). Os solventes grau HPLC utilizados foram acetonitrila, diclorometano, acetato de etila e acetona, adquiridos de Honeywell Riedel-de-Haën (USA). Os cartuchos de C18 (Chromabond, 500 mg) foram adquiridos de Machery-Nagel (Alemanha), C18 e os cartuchos OASIS HLB (200 mg) foram adquiridos de Waters (USA). O adsorvente PSA foi adquirido de Supelco (USA) e MgSO_4 e NaCl foram adquiridos de Sigma Aldrich

3.4 LIMPEZA DOS MATERIAIS

Os materiais de vidro, tais como pipeta pasteur, tubos de centrífuga (10 mL e 5 mL) e *vials* (2 mL) foram muflados, a 380 °C por 6 horas, antes de sua utilização. Os demais materiais como béquers, espátulas e provetas foram deixados em uma solução aquosa com 5% de detergente Extran neutro (Merck S.A) por pelo menos 24 horas antes da sua utilização. Posteriormente, foram enxaguados com água corrente, água deionizada, água Milli-Q e, por fim, acetona grau HPLC. Todos esses procedimentos foram realizados a fim de eliminar contaminantes orgânicos em nível traço que pudessem estar adsorvidos ao material e interferir nas análises cromatográficas.

3.5 PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÃO

Soluções estoque de cada composto foram preparadas a uma concentração de 1000 mg L⁻¹. Para isso, 10 mg de cada composto foram pesados diretamente em um balão volumétrico de 10 mL, e o volume foi completado com acetona grau HPLC. A seguir, a solução foi transferida para frascos de 10 mL para armazenamento, sendo que os compostos aromáticos foram armazenados em frascos âmbar para evitar fotodegradação. Posteriormente, foi preparada, em um *vial* de 2 mL, uma solução padrão contendo todos os 10 OPFRs a uma concentração de 4 mg L⁻¹ (em acetona HPLC), utilizando uma microseringa. É importante ressaltar que a microseringa utilizada foi higienizada com acetona HPLC por 20 vezes posteriormente a cada transferência de volume, evitando assim a contaminação cruzada das soluções de estoque.

3.6 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO

Inicialmente, foi realizado um ensaio de recuperação utilizando o método QuEChERS clássico e QuEChERS com modificações para a matriz leite bovino. As modificações no método QuEChERS foram realizadas visando à concentração de todo o extrato. Para isso, após a etapa de extração, o extrato foi congelado visando facilitar a retirada do sobrenadante (fase orgânica – acetonitrila) e remover parte dos interferentes por partição à baixa temperatura. Diversos testes foram realizados visando remover interferentes do extrato concentrado. O primeiro teste com modificações foi realizado com uso de cartuchos de extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*) contendo os adsorventes C18 ou HLB, realizado após o *clean-up* com PSA utilizando extração em fase sólida dispersiva (d-SPE, do inglês *dispersive solid phase extraction*). Posteriormente, foi avaliada a eficiência da utilização de C18 em associação ao PSA na etapa de d-SPE. Finalmente, foram realizados testes com os solventes diclorometano, acetato de etila e acetonitrila para enxágue do adsorvente após o *clean-up* por d-SPE. O procedimento de extração otimizado foi aplicado para as demais matrizes (composto lácteo, arroz e feijão). Para estimar os valores de recuperação, foram realizadas amostras fortificadas com

padrões e *surrogates* deuterados, que foram dopadas antes da extração. Também foram preparadas amostras que foram dopadas, após a extração, com as mesmas quantidades de OPFRs e *surrogates* diretamente no extrato seco da matriz, denominadas neste estudo como “referências”. Por fim, foi utilizada a razão área do pico do composto / área do pico do surrogate obtido para as amostras referência para estimar a recuperação dos compostos (sinal analítico equivalente a 100% de recuperação). Durante os ensaios de recuperação também foram preparados brancos de procedimento, utilizando 5 mL de água ultrapura e extraído conforme as demais amostras, a fim de verificar a ocorrência de contaminação com OPFRs durante o procedimento de extração. A seguir encontram-se descritos estes procedimentos.

QuEChERS CLÁSSICO

Um ensaio preliminar foi realizado utilizando extração QuEChERS clássico, baseado no estudo de Anastassiades et al. (2003), para estimar a recuperação dos analitos. Foram utilizados 5 mL de leite bovino, adquirido em supermercado na cidade de Limeira-SP. Antes de iniciar a extração foram fortificadas 4 amostras com 250 µL de padrão de OPFRs a 4 mg L⁻¹ e com 50 µL de uma solução de *surrogate* deuterado contendo TNBP-D27 e TPHP-D15 na concentração de 5 mg L⁻¹. As amostras foram homogeneizadas por 1 minuto no vórtex e armazenadas na geladeira até a extração no dia seguinte.

Para extrair foram adicionados 5 mL de acetonitrila e agitado por 1 minuto no vórtex. A seguir foram adicionados 0,5 g de NaCl e 2g de MgSO₄. A amostra foi homogeneizada por 1 minuto no vórtex e a separação de fases ocorreu após a centrifugação (10 minutos a 4000 rpm). Foi feito o *clean-up* em d-SPE utilizando 1 mL do sobrenadante, que foi retirado com o auxílio de uma pipeta automática e transferido a um *vial* de 2 mL. Foram adicionados 150 mg de PSA e 50 mg de MgSO₄ ao *vial* contendo o extrato da amostra, a mistura foi agitada por 1 minuto no vórtex e centrifugada por 10 minutos a 4000 rpm. Por fim, foi retirado 500 µL do sobrenadante e transferido para outro *vial* de 2 mL, evaporado utilizando gás nitrogênio e ressuspendido com 500 µL de acetato de etila para posterior análise no GC-MS.

Para a preparação das referências, foi realizado o mesmo procedimento para 2 amostras de leite bovino de 5 mL. Porém, a fortificação destas amostras com padrão

de OPFRs e surrogates ocorreu ao final do procedimento de extração, diretamente no *vial* de 2 mL contendo o extrato seco da matriz, e a seguir foi avolumado até 500 μL com acetato de etila.

EXTRAÇÃO QuEChERS MODIFICADA

CLEAN-UP UTILIZANDO d-SPE COM PSA E CARTUCHOS SPE

Foram preparadas 3 amostras fortificadas, 1 referência e 1 branco do procedimento para cada um dos procedimentos descritos a seguir. Vale ressaltar que o branco do procedimento foi realizado com o intuito de avaliar a contaminação durante a extração. Para isso, em cada teste, foi realizado o branco do procedimento seguindo a mesma metodologia das amostras, sem a presença da matriz, sendo apenas adicionados os *surrogates* antes da extração.

Nos testes, foram utilizados 5 mL de leite bovino em tubos de centrífuga de vidro. Em cada amostra fortificada foram adicionados 50 μL de *surrogates* a 0,5 mg L⁻¹ (em acetona) e 25 μL de padrão a 4 mg L⁻¹ (em acetona). , homogeneizado no vórtex e armazenado na geladeira por aproximadamente 8-12 h. No dia seguinte foi realizada a extração, adicionando 5 mL de acetonitrila nas amostras e posteriormente homogeneizando a mistura por 1 minuto no vórtex. A seguir foram adicionados 2 g de MgSO₄ e 0,5 g de NaCl em todos os tubos. Após agitação por 1 min no vortex e centrifugação por 10 minutos na centrífuga a 3500 rpm.

Os frascos foram deixados no freezer por no mínimo 8h para ocorrer a partição a baixa temperatura, onde a fase aquosa e lipídica solidificaram, permanecendo líquida somente a fase orgânica (acetonitrila), situada na parte superior do frasco. Após esta etapa, foi transferida toda a fase orgânica do extrato da amostra para um tubo graduado de 5 mL e evaporado até 750 μL utilizando fluxo brando de N₂.

Antes de iniciar o *clean-up* as peças do manifold a vácuo que tem contato com o cartucho foram enxaguadas com acetona grau HPLC para limpeza. Os cartuchos C18 e HLB foram acoplados ao manifold e condicionados com 6 mL de acetonitrila. O solvente foi quase todo eluído por ação da gravidade, evitando a “secagem” do cartucho. A seguir, tubos de ensaio de 12 mL foram alocados no manifold para recolher o extrato. O extrato de leite bovino obtido após a etapa de *clean-up* em d-

SPE com PSA foi transferido para o cartucho, e o tubo que o continha foi enxaguado com 250 μL de acetonitrila por 3 vezes, com o intuito de transferir todo o analito. Após esta etapa, deixou-se percolar quase todo o extrato, tomando o cuidado de não deixar o cartucho secar, e a seguir foi realizada a eluição com 6 mL de acetonitrila. Após o *clean-up* o conteúdo no tubo de ensaio que recolheu o eluato foi evaporado com gás nitrogênio, com o auxílio de aquecimento em banho maria ($40\text{ }^{\circ}\text{C}$), até aproximadamente 1 mL. O extrato concentrado foi transferido para um *vial*, e o tubo do extrato foi enxaguado com 3 porções de 250 μL de acetonitrila, sendo o solvente de enxágue transferido para o respectivo *vial* contendo o extrato. Finalmente, o extrato contido no *vial* de cromatografia foi evaporado completamente (posteriormente, as referências foram dopadas com as mesmas quantidades e concentrações das amostras fortificadas), redissolvido com 200 μL de acetato de etila e agitado no vórtex por 15 segundos para homogeneizar. O procedimento encontra-se na Figura 2.

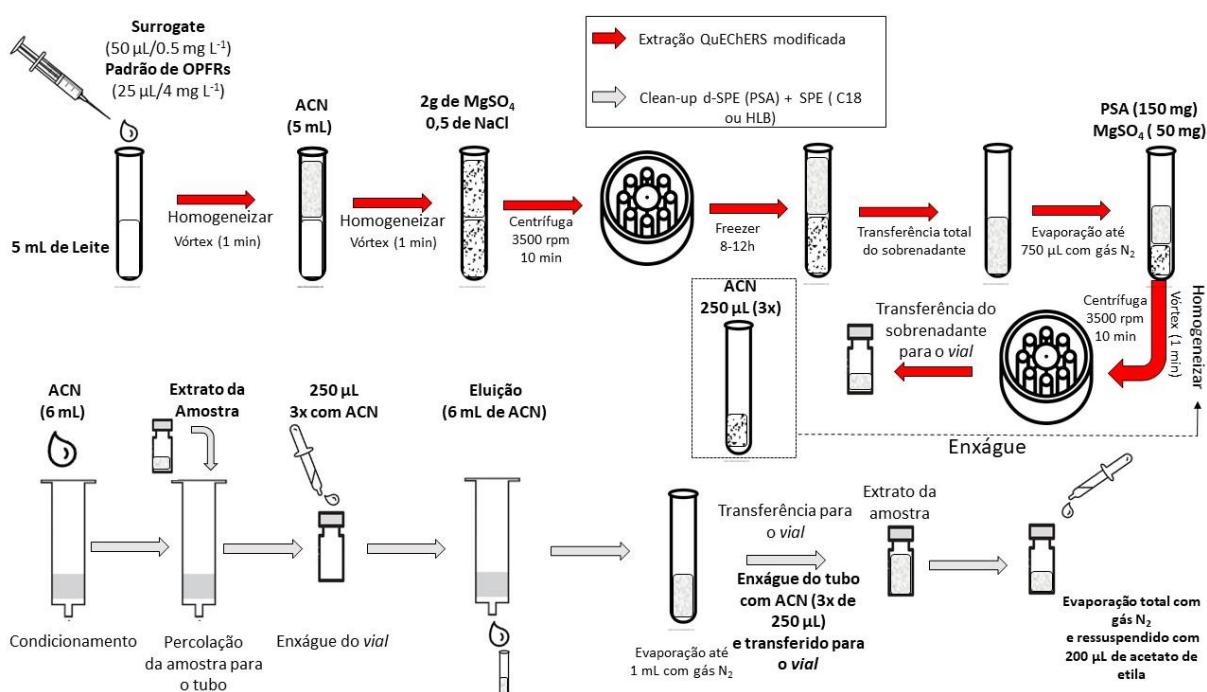


Figura 2: Extração QuEChERS modificada e clean-up d-SPE (PSA) + SPE (C18 ou HLB) realizado em amostras de leite bovino. Fonte: autoria própria.

CLEAN-UP UTILIZANDO d-SPE COM PSA + C18 E TESTES DE ENXÁGUE DOS ADSORVENTES

Foram realizadas 3 amostras fortificadas com matriz, 2 referências com matriz e 1 branco do procedimento com o uso de PSA (150 mg) e C18 (100 mg) em d-SPE na fase do *clean-up*.

Além do uso do C18 em associação ao PSA, a fim de melhorar a recuperação dos compostos mais apolares que podem ter ficado retidos nos adsorventes, foram testados o uso dos solventes diclorometano, acetonitrila e acetato de etila para enxágue do adsorvente após a etapa de *clean-up* utilizando d-SPE. Foram realizadas 3 amostras fortificadas e 1 referência para cada teste com solventes para avaliar a recuperação dos analitos nas amostras de leite bovino. Para isso, após a extração e partição a baixa temperatura, o sobrenadante foi totalmente transferido para um tubo de centrifuga de vidro de 5 mL e evaporado até 2 mL. Foram adicionados PSA (150 mg), MgSO₄ (50 mg) e C18 (100 mg), agitado por 1 minuto no vórtex e centrifugado a 3500 rpm por 10 minutos. Após esta etapa, o sobrenadante foi transferido para um *vial* e evaporado até quase secar. O tubo de centrifuga contendo os adsorventes foi então enxaguado com 2 mL do solvente (diclorometano, acetonitrila ou acetato de etila), agitado por 1 minuto no vórtex e centrifugado a 3500 rpm por 10 min. O sobrenadante foi totalmente transferido para o respectivo *vial* contendo o extrato, evaporado totalmente e, por fim, as amostras foram ressuspensas com 200 µL de acetato de etila e agitado no vórtex para análise no GC-MS.

3.7 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA AMOSTRAS DE LEITE BOVINO, COMPOSTO LÁCTEO, ARROZ E FEIJÃO

Com base nos resultados obtidos nos ensaios de otimização utilizando leite bovino, foram realizados ensaios de recuperação para cada matriz com amostras fortificadas e brancos do procedimento, e posteriormente determinado as concentrações de OPFRs para cada matriz com base na curva analítica. Para as amostras de leite bovino, foram utilizados 5 mL da amostra e transferidos para tubos de centrifuga de vidro. As amostras de composto lácteo foram pesadas diretamente no tubo de centrifuga de vidro (0,7 g da amostra). As amostras de arroz e feijão foram maceradas com o auxílio de pistilo e almofariz para homogeneização (Figura 3 e 4), e a seguir 1,5 g da amostra foi transferida e pesada diretamente no tubo de centrifuga de vidro. Para evitar a contaminação cruzada, o pistilo e o almofariz foram lavados

com o detergente extran por 10 minutos no ultrassom, três vezes com água destilada, água Milli-Q e acetona grau HPLC depois de cada maceração.

O método de extração otimizado para as amostras de leite bovino foi utilizado para as amostras de composto lácteo, arroz e feijão. Para isso, foram preparadas 3 amostras fortificadas com 100 ng (25 μL de uma solução contendo os 10 OPFRs na concentração 4 ng μL^{-1}) e 3 amostras fortificadas com 10 ng (25 μL de uma solução contendo os 10 OPFRs na concentração 0,4 ng μL^{-1}), e dopadas com 25 ng dos surrogates (50 μL de uma solução contendo os surrogates na concentração 0,5 ng μL^{-1}), 4 referências, 3 brancos (dopadas apenas com *surrogates* no início da extração) e 1 branco do procedimento.

Para a extração, foram adicionados 5 mL de acetonitrila, 4 mL de água (para as amostras sólidas), agitação em vórtex por 1 minuto e ultrassom por 10 minutos. Foram adicionados MgSO_4 (2g), NaCl (0,5g) e finalmente homogeneizadas por 1 minuto no vórtex, centrifugadas por 10 minutos e armazenadas no *freezer* por 12h para ocorrer a partição a baixa temperatura. Para realizar o *clean-up* foi utilizado todo o sobrenadante, evaporado até 2 mL com gás N_2 , adicionado C18 (100mg), PSA (150) e MgSO_4 (50 mg), homogeneizadas por 1 minuto no vórtex, centrifugadas por 10 minutos a 3500 rpm. Todo sobrenadante foi transferido a um *vial*, evaporado quase toda a amostra com gás N_2 , o tubo foi enxaguado com acetato de etila (2mL) e homogeneizadas no vórtex por 1 minuto e centrifugada por 10 minutos a 3500 rpm. Todo o sobrenadante foi transferido a um *vial* e evaporado com gás N_2 (as referências foram dopadas com as mesmas concentrações das amostras fortificadas no início), evaporadas e ressuspendidas com 500 μL de acetato de etila.

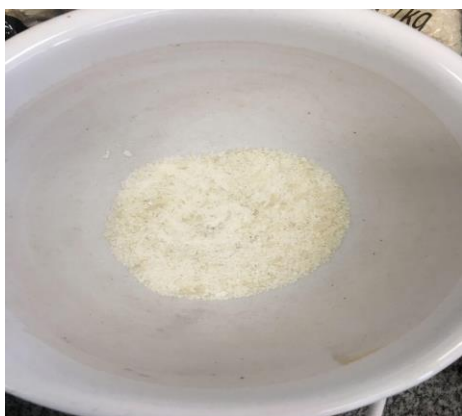


Figura 3: Maceração das amostras de arroz



Figura 4: Maceração das amostras de feijão

Para a validação do método QuEChERS modificado para as matrizes arroz, feijão, composto lácteo e leite bovino, foram avaliados os seguintes parâmetros: recuperação, efeito matriz, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ).

3.7.1 RECUPERAÇÃO

Para verificar a exatidão e precisão do método analítico, foram realizados testes de recuperação a partir da fortificação (em triplicata) de amostras das matrizes arroz, feijão, leite bovino e composto lácteo, conforme descrito acima. Além disso, duas amostras (sem fortificação) foram extraídas a fim de subtrair a concentração de OPFRs dos valores de recuperação, quando fosse o caso. As recuperações foram calculadas conforme mostrado na equação 5.

3.7.2 CALIBRAÇÃO E LINEARIDADE

Foram realizadas calibrações no equipamento GC-MS utilizando sete concentrações, na faixa de 0,005 a 0,5 mg L⁻¹, e foi adicionado em cada ponto 50 µL de uma solução contendo os dois surrogates deuterados (TNBP-D27 e TPHP-D15) na concentração de 0,5 mg L⁻¹. As curvas foram construídas utilizando no eixo y a razão entre a área do pico do composto / área do pico do surrogate (razão de áreas), e no eixo x a respectiva concentração do analito. O surrogate TNBP-D27 foi utilizado para quantificar os compostos TIBP, TNBP, TCEP e TCIPP enquanto o surrogate TPHP-D15 foi utilizado para quantificar os compostos TDCIPP, TBOEP, TPHP, EHDPHP, TEHP e TMPP.

Diferentes curvas analíticas foram preparadas, utilizando solvente puro (acetato de etila), o extrato seco do branco do procedimento (obtido após a extração de 5 mL de água Milli-Q, utilizando o método QuEChERS otimizado), e curvas com correspondência de matriz, preparadas utilizando o extrato seco das diferentes matrizes (arroz, feijão, leite bovino e composto lácteo). Nos dois últimos casos, foram realizados todos os procedimentos de extração e *clean-up* segundo o método QuEChERS desenvolvido, e as respectivas quantidades de padrão e surrogates

necessárias para preparar os diferentes pontos da curva de calibração foram adicionados diretamente no vial contendo o extrato seco correspondente. Três amostras de cada matriz utilizadas no preparo da curva de calibração foram extraídas e analisadas a fim de verificar a presença de OPFRs e subtrair esta contribuição das respostas analíticas utilizadas para a construção das curvas de calibração.

Para a análise do intervalo linear das curvas foi verificada a concordância entre a concentração teórica e a concentração calculada para cada ponto da respectiva curva de calibração, sendo admitidos erros até $\pm 20\%$ de diferença entre estes valores. Em alguns casos foi considerado aceitável um erro de até 40% para o ponto mais diluído das curvas que contemplavam os menores intervalos de concentração.

3.7.3 LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

Foram utilizadas diferentes metodologias para calcular os limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ). Para os compostos que não foram detectados no branco do procedimento, o LD foi determinado segundo a relação sinal/ruído (S/N), conforme a equação 6:

$$\begin{aligned} &\text{Equação 6} \\ &LD = 3 * S/N \end{aligned}$$

O LQ foi calculado conforme a equação 7:

$$\begin{aligned} &\text{Equação 7} \\ &LQ = 10 * S/N \end{aligned}$$

Para os compostos que foram detectados nos brancos de procedimento, o LD foi determinado utilizando a resposta analítica obtida para os brancos de procedimento ($n=6$) (área do pico do composto dividida pela área do pico do surrogate) conforme a Equação 8:

$$\begin{aligned} &\text{Equação 8} \\ &YLD = \bar{Yb} + 3 * DPb \end{aligned}$$

Onde,

YLD = Resposta analítica referente ao Limite de Detecção ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$);

$\bar{Y}b$ = Média da resposta analítica observada nos brancos;

DPb = Desvio padrão da média.

O YLD foi substituído na equação da curva de calibração com correspondência de matriz do respectivo composto para obter-se o LD em termos de concentração no extrato.

O LQ foi calculado de maneira similar, porém a média da resposta analítica do branco foi somada a dez vezes o desvio padrão desta média.

Finalmente, todos valores de limite de detecção e limite de quantificação do método analítico (LDM e LQM), previamente calculados em termos de concentração nos extratos ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$), tiveram as unidades transformadas para ng g^{-1} de alimento (arroz, feijão, composto lácteo) ou ng mL^{-1} (leite bovino) pela equação 9.

Equação 9

$$LDM [LQM] (\text{ng g}^{-1}) = LD[LQ] (\text{ng } \mu\text{L}^{-1}) \times V / Q$$

Onde,

V = Volume total do extrato

Q = Quantidade de amostra de alimento extraída

3.7.4 EFEITO MATRIZ

A avaliação do efeito matriz foi realizada a partir das três curvas: curva no solvente (CS), curva no extrato do branco de procedimento (CEBP) e a curva no extrato da matriz (CEM), que foram descritas anteriormente. Foram comparados os valores de recuperação obtidos utilizando as diferentes curvas e a inclinação de cada curva. O efeito matriz (EM) foi calculado comparando as inclinações de CEM com curvas CS ou CEBP, segundo o estudo de Cristale et al. (2020), usando a seguinte equação 10:

Equação 10:

$$EM (\%) = \left[\left(\frac{\text{Inclinação da CEM}}{\text{Inclinação da CS (ou CEBP)}} \right) - 1 \right] \times 100$$

Os resultados foram classificados em baixo EM ($-20\% < EM < 20\%$), intermediário EM ($-50\% < EM < -20\%$ e $20\% < EM < 50\%$) e alto EM ($-50\% > EM$ e $EM > 50\%$).

3.7.5 TESTE t DE DADOS PAREADOS

Foi realizado o teste t de dados pareados, segundo Quintana et al. (2018), a fim de verificar se teve diferença significativa entre as curvas, ou seja, se a presença de co-extrativos dos adsorventes e da matriz podem promover o efeito matriz. Comparou-se os pontos das curvas no solvente e a curva no extrato do branco do procedimento em relação as curvas no extrato da matriz. Foram estabelecidas as hipóteses, o $t_{\text{calculado}}$ e o $t_{\text{crítico}}$ (bicaudal) considerando 95% de confiança, segundo a Equação 10:

$$\text{Equação 10: } t = d \frac{\sqrt{n}}{Sd}$$

Onde:

d = é a média das diferenças entre os pares;

Sd = desvio padrão de d ;

n = número de pontos.

Vale ressaltar que antes do cálculo do teste t pareado, os dados foram normalizados dividindo a resposta analítica (área do composto / área do surrogate) obtida para o ponto da curva pela concentração correspondente. Adotou-se como estratégia a comparação das amostras, feito dois a dois, a fim de avaliar a diferença entre cada par. Foi considerado como hipótese nula que as curvas não apresentam valores significamente diferentes.

3.7.6 ANÁLISE INSTRUMENTAL

Foi utilizado o Cromatógrafo Gasoso Trace GC Ultra (Thermo) acoplado a um espectrômetro de massas ITQ900 (Thermo) com analisador de massas tipo *ion trap*. O Injetor foi do tipo que permite vaporização com temperatura programável (do inglês *programmable temperature vaporization* – PTV), e o liner foi um PTV Straight Liner

(120 × 2.75 mm, 1 mm d.i, Thermo). A injeção PTV operou na temperatura inicial de 40°C durante 0,25 min com a válvula split aberta e o fluxo de gás a 10 mL/min. Em seguida, a válvula split foi fechada e o injetor foi aquecido a 280°C a 3°C/seg e mantido na temperatura final durante 5 minutos. O sistema é equipado com um amostrador automático (TriPlus). A coluna cromatográfica foi uma Zebron ZB5-MS de 30 m (comprimento) x 0.25 mm (d.i.) x 0.25 µm (filme) (Phenomenex, EUA), e a fase móvel foi gás hélio de alta pureza a uma vazão de 1,5 mL min⁻¹. A programação de temperatura do forno da coluna foi ajustada para 60°C por 6 minutos, e depois aquecido a uma taxa de 10°C min⁻¹ até 230°C e mantido nesta temperatura por 1 minuto. Em seguida, o forno da coluna foi aquecido a uma taxa 20°C min⁻¹ até 280°C e mantido nesta temperatura por 14 minutos (CRISTALE et al., 2020).

A Tabela 4 mostra o tempo de retenção de cada composto, bem como as condições de detecção utilizadas (íon de quantificação e o íons de confirmação).

Tabela 4: Tempo de retenção, íons de quantificação e íons de confirmação utilizados na detecção em modo SIM para cada OPFRs.

COMPOSTO	TEMPO DE RETENÇÃO	ÍON DE QUANTIFICAÇÃO	ÍON DE CONFIRMAÇÃO
TiBP	17,13	99	139
TNBP	18,71	99	125
TCEP	20,08	249	251; 99
TCIPP	20,34	201; 125*	99
TDCIPP	25,53	191	381; 99
TBOEP	26,02	125*; 199	99
TPHP	26,02	325	233; 326
EHDPPH	26,15	251	249
TEHP	26,49	99	113

TMPP	27,65 - 28,39	367	261; 368
TNBP-D27	18, 49	103	231
TPHP-D15	26, 00	243	341

*Utilizados na curva da matriz

3.8 COLETA DE AMOSTRAS

As amostras de leite líquido integral bovino, composto lácteo, arroz e feijão foram adquiridas em supermercados de Limeira-SP. Buscou-se escolher os mesmos tipos de arroz e feijão, arroz branco e feijão carioca. Foram analisadas 6 marcas das matrizes de arroz, feijão e composto lácteo e 7 marcas de leite líquido integral bovino. As amostras frescas foram armazenadas na geladeira no laboratório GOTAS, e as amostras secas foram armazenadas em temperatura ambiente. As amostras foram extraídas antes da data de vencimento, e denominadas neste estudo como amostras A, B, C, D, E, F e G a fim de preservar a identidade das marcas.

Haja vista a natureza deste trabalho, a presente proposta de pesquisa foi dispensada de avaliação pela comissão de ética do uso de animais da CEUA/UNICAMP, pois corresponde a trabalho relativo às análises químicas com uso não vivo de alimentos de origem animal (leite líquido integral bovino e composto lácteo) e vegetal (arroz e feijão) adquiridos em estabelecimentos comerciais com marcas não identificadas e sem qualquer manipulação *in vivo* na UNICAMP para a execução do projeto.

3.9 ESTIMATIVA DA INGESTÃO DIÁRIA DOS OPFRs VIA ALIMENTAÇÃO (EDI)

A partir dos dados determinados nos alimentos estudados, foram estimados os valores de ingestão diária desses compostos para a população brasileira. Para isso, foram realizados cálculos a partir dos dados de ingestão per capita de cada alimento por dia, segundo dados do IBGE (2017-2018), em relação à concentração média de OPFRs em cada matriz que foi estudada no presente estudo, e a média do peso corporal dos brasileiros em kg.

Para estimar a ingestão diária (EDI) de OPFRs por meio da ingestão dos alimentos foi utilizada a equação 1.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA E CONDIÇÕES DE DETECÇÃO

A Figura 5 mostra o cromatograma obtido no GC-MS, operando em modo SIM, para os dez OPFRs e dois surrogates deuterados, nas concentrações de 4 mg L⁻¹ e 0,5 mg L⁻¹, respectivamente. É possível perceber que os compostos TPHP, TBOEP e TPHP-D15 coeluem no tempo de retenção 26,02 min, que foi resolvido filtrando o cromatograma utilizando os íons de quantificação dos compostos.

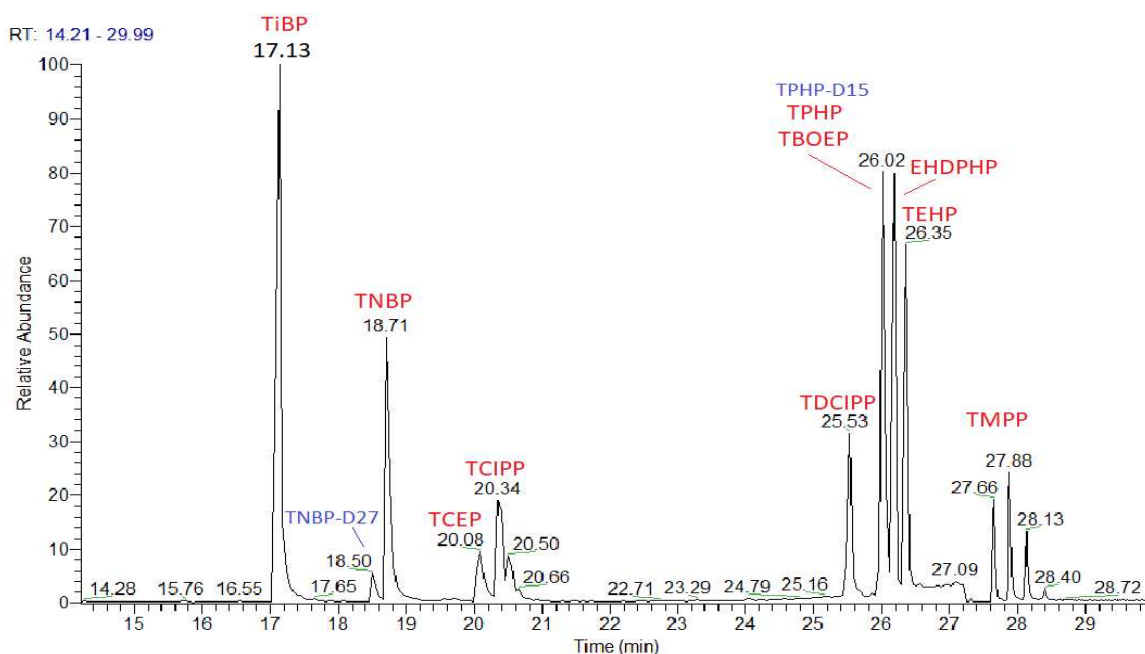


Figura 5: Cromatograma dos OPFRs obtido utilizando o modo SIM no GC/MS.

4.2 TESTES DE EXTRAÇÃO QuEChERS E OTIMIZAÇÃO

4.2.1 QuEChERS CLÁSSICO

No estudo inicial foram empregados 9 OPFRs e dois surrogates para avaliar a performance do método QuEChERS clássico para determinação de OPFRs em leite

bovino. Os valores de recuperação variaram de 62 a 116% e o desvio padrão relativo ficou entre 4 a 47%. Porém, o composto TEHP mostrou baixo valor de recuperação, de 34%, e desvio padrão relativo de 80%, como demonstrado na Figura 6. A baixa recuperação do TEHP deve estar relacionada com a baixa polaridade do composto, favorecendo que ele permaneça associado à gordura do leite bovino, além disso, podem ter ficado parcialmente retidos no adsorvente PSA durante a etapa de d-SPE.

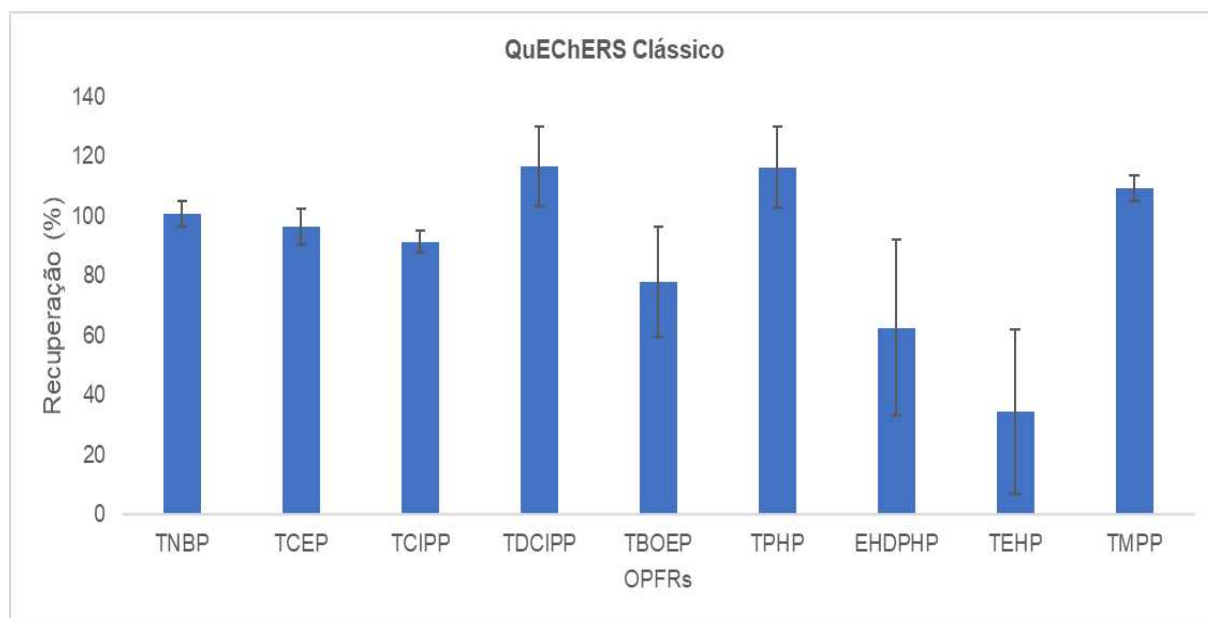


Figura 6: Valores de recuperação para 9 OPFRs na extração QuEChERS tradicional de leite bovino proveniente de supermercado.

O teste do QuEChERS clássico foi utilizado como uma avaliação preliminar para verificar se esta metodologia de extração com acetonitrila poderia ser utilizada para determinação de OPFRs em leite bovino. Como mostrou-se adequada para a maioria dos compostos, partiu-se para a otimização e modificação do procedimento, visando diminuir o LD utilizando todo o extrato (e não só parte dele como ocorre no QuEChERS clássico), e concentrando o mesmo após a extração.

4.2.2 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO QuEChERS

Com objetivo de obter menores limites de detecção e extratos livres de interferentes, foi realizada uma extração QuEChERS modificada utilizando partição a baixa temperatura após a extração com acetonitrila. Outra modificação foi a utilização

de todo o extrato e sua concentração antes da etapa de *clean-up* por d-SPE. Além disso, foi testada também a utilização de uma etapa de *clean-up* adicional (após o d-SPE com PSA) utilizando cartuchos SPE (C18 ou HLB), e a utilização de C18 juntamente ao PSA na etapa de d-SPE.

A Figura 7 apresenta as recuperações obtidas utilizando QuEChERS com partição a baixa temperatura seguido de *clean-up* por d-SPE (PSA+C18) (utilizando todo o extrato), e também as recuperações obtidas ao realizar etapas adicionais de *clean-up* com cartuchos SPE (C18 ou HLB).

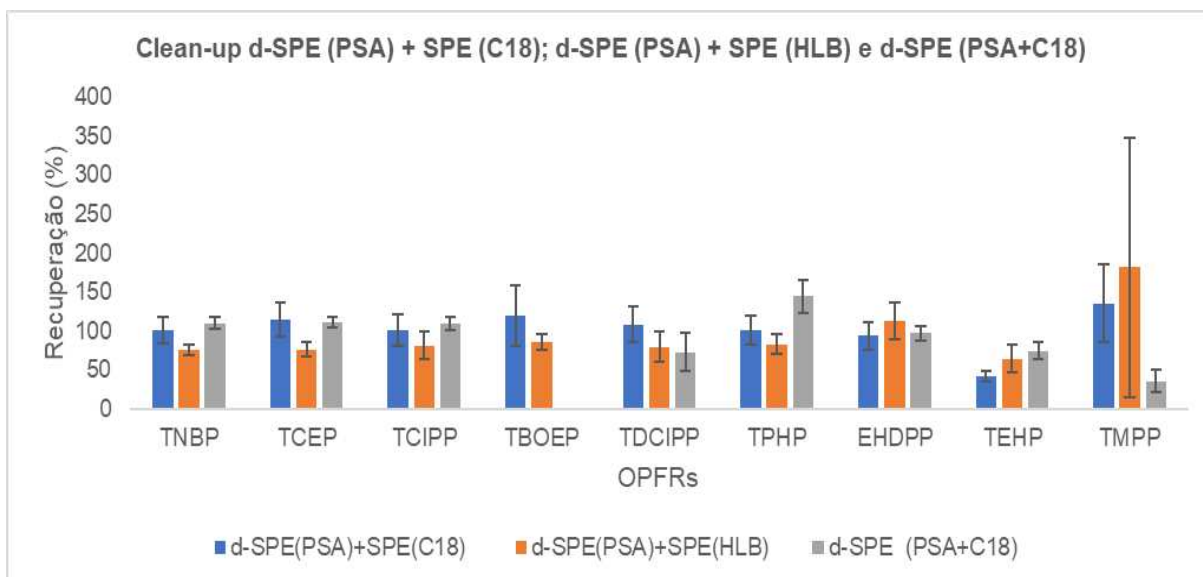


Figura 7: Valores de recuperação de 9 OPFRs na extração de leite bovino utilizando QuEChERS modificado e diferentes procedimentos de *clean-up* d-SPE(PSA+C18) ; d-SPE(PSA)+SPE(C18) e d-SPE(PSA)+SPE(HLB)

Os valores de recuperação do teste d-SPE(PSA+C18) variaram de 70% a 111% e desvio padrão relativo entre 6 a 25%. Apenas os compostos TPHP e TMPP não obtiveram bons valores, com recuperação de 144% e 36%, e desvio padrão relativo de 21% e 14%, respectivamente, e o TBOEP não foi possível quantificar pois não foi detectado, como mostra a Figura 7.

O teste realizado com o cartucho C18 a recuperação variou de 90 a 120% e desvio padrão relativo de 16 a 32%, exceto para os compostos TEHP e TMPP que ficou com 42 e 136% e desvio padrão relativo de 16 e 36%, respectivamente. Com o cartucho HLB variou de 76 a 113% e desvio padrão de 9 a 24%, exceto para os compostos TEHP e TMPP que obtiveram 65 e 182% e desvio padrão relativo de 28% e 91%, respectivamente.

Portanto, diante dos resultados de recuperação obtidos os autores optaram pelo método utilizando d-SPE(PSA+C18) foi mais eficiente em comparação com os testes d-SPE(PSA)+SPE(HLB) e d-SPE(PSA)+SPE(C18).

TESTE DE LIMPEZA DO ADSORVENTE DE d-SPE COM DIFERENTES SOLVENTES

Para melhorar a recuperação dos compostos mais apolares, que podem ter ficado retidos no adsorvente na etapa de d-SPE com PSA+C18, foram feitos testes de lavagem do adsorvente com o uso de 3 solventes (acetonitrila, diclorometano e acetato de etila) e os dados podem ser verificados na Figura 8.

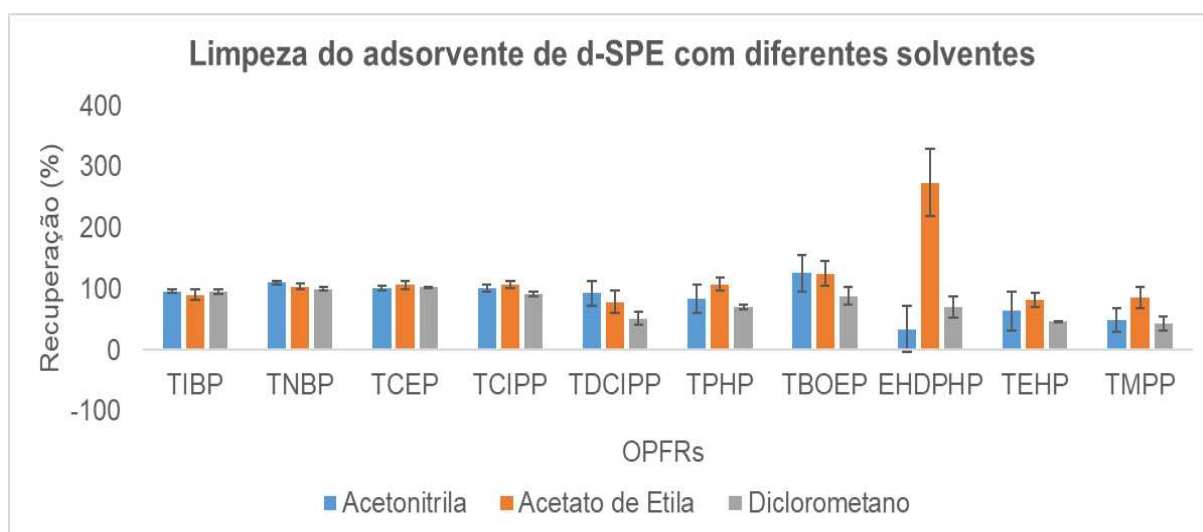


Figura 8: Teste com os solventes diclorometano, acetato de etila e acetonitrila para lavagem do adsorvente C18+PSA após o *clean-up*.

Segundo os dados obtidos, no teste com o uso da acetonitrila, os compostos EHDPHP, TEHP e TMPP não apresentaram bons valores de recuperação, que variaram entre 33% e 64%, com desvio padrão relativo entre 40% e 113%. No teste com diclorometano, o composto TDCIPP, TEHP e TMPP apresentaram baixos valores de recuperação, entre 42 a 51% com desvio padrão relativo entre 19 a 26%. Por fim, o teste com o solvente acetato de etila foi o que apresentou a melhor performance, pois apenas o composto EHDPHP apresentou resultado insatisfatório, com recuperação de 273% e desvio padrão relativo de 20%. Portanto, o solvente acetato de etila foi escolhido para realizar a lavagem dos adsorventes após o *clean-up* utilizando d-SPE.

O método QuEChERS modificado, com o uso de PSA+C18 em d-SPE e acetato de etila para enxágue dos adsorventes após a etapa de *clean-up*, foi utilizado para extrair as matrizes leite bovino e em pó integral bovino, arroz e feijão.

4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

4.3.1 EFEITO MATRIZ

Foi comparada a inclinação da reta das diferentes curvas: curva no extrato da matriz (CEM), curva no extrato do branco de procedimento (CEBP) e curva no solvente (CS), como mostra a Figura 9. Os compostos TiBP, TNBP, TBOEP e TEHP não foram incluídos na figura, pois os compostos não obtiveram uma boa linearidade na CEBP ou na CS, não sendo possível calcular o efeito matriz. Também não foi possível calcular o efeito matriz para os compostos TDCIPP e TBOEP para leite bovino e composto lácteo, pois não foi possível obter boa linearidade para esses compostos na CEM.

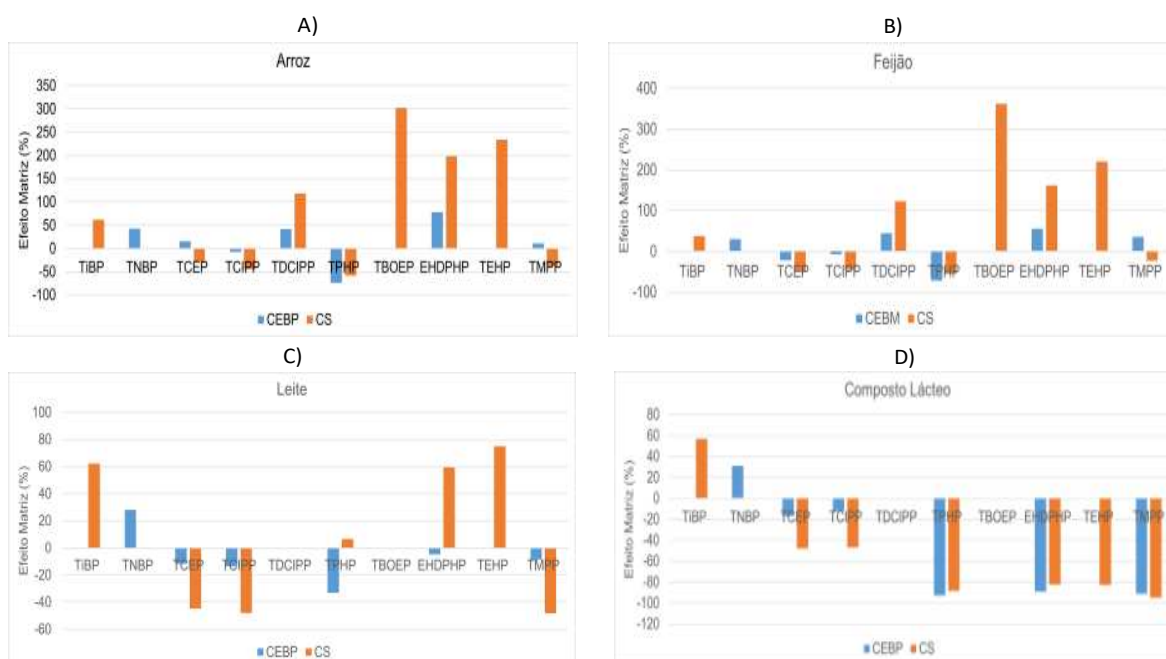


Figura 9: Efeito matriz (%) obtido pra CS e CEBP em relação a curva no extrato do arroz, feijão, leite bovino e composto lácteo.

Na Figura 9, é possível perceber que a tendência do efeito matriz na CS é sempre média ou alta. As diferenças observadas ao comparar a curva preparada no solvente puro e a curva preparada utilizando o extrato da matriz pode ser devido à uma diferente retenção dos analitos no sistema de injeção quando os analitos são

preparados em solvente, afetando a quantidade de analitos transferidos para a coluna e consequentemente para o detector (CRISTALE et al., 2020). No presente estudo, quando as recuperações dos analitos foram calculadas a partir da curva no solvente, mostraram valores muito altos em alguns casos, chegando a atingir 300% (EHDPHP) de recuperação, enquanto em outros casos foi observado valores muito baixos como 0,2% (TEHP).

Na CEBP, alguns compostos tiveram um efeito matriz baixo, mas a tendência do efeito matriz para a maioria dos compostos foi um efeito matriz médio e alto, como mostra a Figura 9. No estudo de Cristale et al. (2020), os melhores resultados foram observados com a curva no extrato de branco de procedimento em relação à curva no solvente. Os autores constataram que os co-extrativos do cartucho HLB atuam como protetores bloqueando os sítios ativos do injetor, coluna e detector, resultando em bom desempenho cromatográfico dos OPFRs e compensando o efeito matriz de extratos de água de rio. Porém, no presente estudo a curva no extrato do branco de procedimento não foi suficiente para corrigir o efeito matriz, pois as respostas podem variar em relação aos adsorventes e tipo de matriz. Nas matrizes analisadas, tiveram presença de co-extrativos como a gordura do leite bovino e pigmentos, que permaneceram solubilizados nos extratos, mesmo após a purificação da amostra, o que pode promover o efeito matriz nas análises cromatográficas (RUTKOWSKA et al., 2019). A performance cromatográfica é afetada pela competição entre os analitos e os componentes extraídos da matriz pelos sítios ativos do sistema injetor. Vale ressaltar, que esses sítios ativos são formados por grupo silanóis livres e metais presentes na superfície do liner (tubo de vidro) presente no sistema injetor, e também compostos não voláteis que se depositam durante repetidas análises (RUTKOWSKA et al., 2019).

Por fim, para analisar a diferença estatística, foi aplicado o teste *t* pareado para comparar as diferentes curvas para cada OPFRs. Conforme observado no Anexo I, foi observada diferença estatística entre as curvas para vários analitos em todas as matrizes. Diante destes resultados, optou por realizar uma curva no extrato da matriz. Sendo assim, foi possível avaliar a recuperação, linearidade, limites de detecção e quantificação que estão detalhados no tópico seguinte.

4.4 LINEARIDADE, RECUPERAÇÕES, LIMITES DE DETECÇÃO E DE QUANTIFICAÇÃO DO MÉTODO

Foram obtidas duas curvas de calibração para a maioria dos compostos, pois não foi linear para toda a faixa de concentração utilizada. Os LDMs e LQMs foram calculados a partir da relação sinal/ruído, exceto os compostos TIBP, TPHP e EHDPHP que foram detectados no branco do procedimento.

Nas amostras de arroz, para as amostras que foram fortificadas com $66,6 \text{ ng g}^{-1}$ de OPFRs as recuperações variaram de 89 a 152% e desvio padrão relativo de 0,8 a 19%. Para as amostras que foram dopadas com $6,66 \text{ ng g}^{-1}$ foi possível quantificar apenas os compostos TIBP e TNBP, que estavam acima do limite de quantificação, com valores de recuperação de 100 e 97% e desvio padrão relativo de 5 e 6%, respectivamente. Os LDMs variaram de 0,1 a 10 ng g^{-1} e LQMs de 0,5 a 35 ng g^{-1} . Para as amostras de arroz, no geral apresentou uma boa performance, já que foi o extrato mais limpo entre outras matrizes.

Para as amostras de feijão, as amostras que foram dopadas com $66,6 \text{ ng g}^{-1}$ as recuperações variaram de 57 a 106% e desvio padrão relativo de 2 a 21%, exceto para o composto TMPP, que teve recuperação de 374%. Para as amostras na concentração $6,66 \text{ ng g}^{-1}$ a recuperação foi de 50 a 86% (TIBP, TNBP e EHDPHP) e desvio padrão relativo de 7 a 10%. Os LDMs variaram de 0,001 a 115 ng g^{-1} e LQMs de 0,5 a 38 ng g^{-1} .

Para as amostras de leite bovino, não foi possível quantificar os compostos TDCIPP e TBOEP. As amostras que foram dopadas com 20 ng mL^{-1} a recuperação variou de 60 a 105% e desvio padrão relativo de 2 a 34%. Para os compostos que puderam ser quantificados no menor nível de fortificação de (2 ng mL^{-1}) a recuperação foi de 47 (EHDPHP) e 98% (TIBP), com desvio padrão relativo de 6 (TIBP) e 43% (EHDPHP). Os LDMs variaram de 0,03 a 7 ng mL^{-1} e LQMs de 0,2 a 26 ng mL^{-1} .

Para os compostos lácteos que foram dopados na concentração de 143 ng g^{-1} as recuperações variaram de 46 a 98% e desvio padrão relativo de 5 a 48% e para a concentração $14,3 \text{ ng g}^{-1}$ somente os compostos TIBP e TCEP puderam ser avaliados, e a recuperação variou de 80 a 120% com desvio padrão relativo de 6 a 13%. Os LDMs variaram de 0,5 a 59 ng g^{-1} e LQMs de 2 a 199 ng g^{-1} . Esta matriz foi a que mais

apresentou interferentes no que resultou em maiores valores de LDMs e LQMs e não obteve bons resultados de recuperação em relação a outras matrizes. Nos compostos lácteos também não foi possível quantificar os compostos TDCIPP e TBOEP pois foram observados interferentes na matriz que afetaram a linearidade da curva de calibração.

Tabela 5: Equação, intervalo linear, coeficiente de determinação, limites de detecção e quantificação do método para as curvas com correspondência de matriz para arroz (ng g^{-1}), feijão (ng g^{-1}), leite bovino (ng mL^{-1}) e composto lácteo (ng g^{-1}).

ARROZ							
OPFRs	Equação	Intervalo Linear	R ²	LDM (ng g^{-1})	LQM (ng g^{-1})	REC (%)	DPR (%)
TIBP	$Y = -0,193654 + 33,8752 \cdot X$	0,05-0,4	0,98	0,94	1,69	89	3
	$Y = -0,135749 + 37,8772 \cdot X$	0,01-0,1	0,99			100	5
TNBP	$Y = 0,405851 + 20,7385 \cdot X$	0,05-0,4	0,99	0,15	0,51	89	6
	$Y = 0,266982 + 24,3457 \cdot X$	0,01-0,1	0,99			97	7
TCEP	$Y = -0,395687 + 3,61431 \cdot X$	0,1-0,4	0,94	2,44	8,15	124	3
TCIPP	$Y = 0,095550 + 5,85381 \cdot X$	0,05-0,4	0,99	7,15	23,85	89	0,8
TDCIPP	$Y = 0,247274 + 1,7152 \cdot X$	0,02-0,4	0,98	5,6	18,65	97	18
TPHP	$Y = 0,517823 + 11,1466 \cdot X$	0,05-0,4	0,98	9,5	26,8	97	15
TBOEP	$Y = 1,26812 + 8,9847 \cdot X$	0,05-0,4	0,99	3,91	13,04	130	28
EHDPPH	$Y = -5,33542 + 121,841$	0,1-0,4	0,95	2,95	9,85	126	10
TEHP	$Y = 2,07751 + 85,6554 \cdot X$	0,05-0,4	0,96	10,54	35,15	94	5
TMPP	$Y = 2,08958 + 6,40481 \cdot X$	0,1-0,4	0,97	3,68	12,26	152	19
Feijão							
OPFRs	Equação	Intervalo Linear	R ²	LDM (ng g^{-1})	LQM (ng g^{-1})	REC (%)	DPR (%)
TIBP	$Y = 0,536347 + 29,0836 \cdot X$	0,05-0,4	0,99	0,16	0,99	89	6
	$Y = -0,042082 + 37,0393 \cdot X$	0,01-0,1	0,98			86	7
TNBP	$Y = 0,238826 + 18,9332 \cdot X$	0,05-0,4	0,99	0,38	1,26	91	3
	$Y = -0,0065759 + 25,711 \cdot X$	0,01-0,05	1,00			70	11
TCEP	$Y = 0,028336 + 2,45318 \cdot X$	0,05-0,4	1,00	3,04	10,14	88	6
TCIPP	$Y = 0,092477 + 1,85486 \cdot X$	0,1-0,4	1,00	5,43	18,1	106	13

TDCIPP	$Y=0,258126+11,9052*X$	0,05-0,4	0,99	6,96	23,21	76	22
TPHP	$Y=0,114028+12,2191*X$	0,05-0,4	0,99	2,59	8,64	76	13
TBOEP	$Y=0,276096+10,3233*X$	0,05-0,4	0,99	11,45	38,19	96	34
EHDPHP	$Y=3,91316+96,0104*X$	0,05-0,4	0,99	0,52	0,52	83	17
	$Y=0,901929+128,569*X$	0,01-0,1	0,99			50	7
TEHP	$Y=2,08662+82,1457*X$	0,05-0,4	0,99	5,59	18,64	57	17
TMPP	$Y=1,34492+9,2218*X$	0,05-0,4	0,90	9,89	32,99	374	21
Leite							
OPFRs	Equação	Intervalo Linear	R ²	LDM (ng mL ⁻¹)	LQM (ng mL ⁻¹)	REC (%)	DPR (%)
TIBP	$Y=0,173219+34,0289*X$	0,05-0,4	0,99	0,031	0,276	92	3
	$Y=0,048719+37,7812*X$	0,01-0,1	0,99			98	6
TNBP	$Y=0,284308+18,6233*X$	0,05-0,4	0,99	1,44	4,8	99	6
TCEP	$Y=0,048444+2,76527*X$	0,05-0,4	0,99	1,07	3,58	87	20
TCIPP	$Y=0,151068+5,46642*X$	0,05-0,4	0,99	3,49	26,6	105	11
TDCIPP							
TPHP	$Y=-3,3099+33,7238*X$	0,1-0,4	0,95	3,00	7,84	80	19
TBOEP							
EHDPHP	$Y=-7,12501+68,8235*X$	0,1-0,4	0,94	0,43	0,98	60	35
	$Y=0,1464+36,022x$	0,01-0,05	0,99			47	43
TEHP	$Y=-4,66289+44,8872*X$	0,1-0,4	0,95	4,47	14,9	80	9
TMPP	$Y=-0,581678+6,20102*X$	0,1-0,4	0,94	1,00	3,33	93	15
Composto lácteo							
OPFRs	Equação	Intervalo Linear	R ²	LDM (ng g ⁻¹)	LQM (ng g ⁻¹)	REC (%)	DPR (%)
TIBP	$Y=-0,011672+32,8642*X$	0,05-0,4	0,99	0,55	2,04	97	9
	$Y=0,060675+32,2623*X$	0,02-0,2	0,99			80	13
TNBP	$Y=0,124837+19,0207*X$	0,05-0,4	0,99	21,77	72,57	96	7
TCEP	$Y=0,038902+2,60057*X$	0,05-0,4	0,99	3,4	11,3	90	5
	$Y=-0,008123+3,40165*X$	0,01-0,1	0,99			80	1

TCIPP	$Y=-0,001410+2,06304*X$	0,05-0,4	0,99	57,3	191	98	6
TDCIPP							
TPHP	$Y=0,053092+3,11583*X$	0,02-0,4	0,96	7,68	25,61	72	15
TBOEP							
EHDPHP	$Y=-0,055313+6,53528*X$	0,05-0,4	0,99	18,78	38,27	46	30
TEHP	$Y=0,10321+4,4011*X$	0,05-0,4	0,99	59,77	199,3	40	48
TMPP	$Y=0,01678+0,661337*X$	0,1-0,4	0,87	26,02	86,73	50	30

4.5 CONCENTRAÇÃO DE OPFRs NAS AMOSTRAS

A Tabela 6 apresenta as concentrações encontradas para cada amostra de leite bovino e em composto lácteo, arroz e feijão.

Tabela 6: Concentrações encontradas nas amostras de arroz, feijão, leite bovino e composto lácteo (ng/g e ng/mL).

Amostras	TiBP	TNBP	TCIPP	TDCIPP	TPHP	TBOEP	EHDPHP	TEHP
ARROZ_A		1,48						
ARROZ_B		<LQ						
ARROZ_C		5,43			<LQ			
ARROZ_D		0,61						
ARROZ_E		2,17						
ARROZ_F		<LQ						
FEIJÃO_A								
FEIJÃO_B		2,74						
FEIJÃO_C		2,73				<LQ		
FEIJÃO_D						<LQ		<LQ
FEIJÃO_F		2,07				<LQ		
LEITE_A							<LQ	
LEITE_B							<LQ	
LEITE_C							<LQ	
LEITE_D							<LQ	
LEITE_E							<LQ	
LEITE_F							<LQ	
LEITE_G								

LEITEPÓ_B	<LQ
LEITEPÓ_C	<LQ
LEITEPÓ_D	<LQ
LEITEPÓ_F	9,06

4.5.1 AMOSTRAS DE ORIGEM VEGETAL

Em todas as amostras de arroz foi encontrado o composto TNBP (0,6 a 5,4 ng/g, média de 2,4 ng/g). Similarmente, no estudo de Zhang et al. (2020) também foi encontrado o composto TNBP em todas amostras de arroz que variou de 0,05 a 0,13 ng/g (média de 0,08 ng/g).

Segundo Zhang et al. (2016) os OPFRs estão presentes principalmente na proteína do arroz (todos os seis OPFRs analisados estiveram presentes na proteína do arroz, 93-96% do total dos OPFRs, enquanto que no amido do arroz continham apenas 3-5% do total dos OPFRs), pois por ser hidrofílica favorece a adsorção dos compostos. O arroz é uma espécie semiaquática que necessita de grande quantidade de água da chuva e irrigação de forma regular, e sendo a água um meio de ocorrência primário de OPFRs no ambiente, o arroz pode ser contaminado por estes compostos durante o cultivo. Zhang et al. (2020) constataram que a água é o principal meio de transferência dos OPFRs. Segundo os autores, a água foi responsável por 80% da entrada do compostos em relação à exposição por ingestão e absorção cutânea por meio da poeira.

Além da água, o solo também pode desempenhar um papel importante no comportamento desses compostos, podendo ocorrer a bioacumulação dos OPFRs durante o plantio do arroz nos campos de cultivo. Além disso, os arrozais próximos à região urbana podem sofrer contaminação por OPFRs resultante da atividade de indústrias de manufatura eletrônica e de plásticos (LIU et al., 2016; WANG et al., 2018).

Segundo Zhang et al. (2020), a temperatura do ambiente também é um fator que pode influenciar no aumento da liberação de OPFRs. Além da temperatura, segundo os mesmos autores, a industrialização e densidade populacional também é um fator importante a ser analisado, sendo que as concentrações de OPFRs no arroz

das áreas industriais urbanas foram significativamente mais altas do que nas áreas rurais e agrícolas.

Assim como o arroz, o feijão também possui um elevado teor de proteínas e de amido, propiciando o acúmulo de OPFRs. Também foi encontrado o composto TNBP nas amostras de feijão (variou de 2,0 a 2,7 ng/g).

Não foram encontrados estudos que reportassem as concentrações de OPFRs em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Porém, foi encontrado um estudo no feijão mungo (*Vigna radiata* L. Wilczek), sendo a espécie de feijão mais usada para investigar a biodisponibilidade de poluentes orgânicos (ZHANG et al., 2020). No estudo de Liu et al. (2019) foi encontrado no broto de feijão mungo o composto TBOEP na concentração 0,09 ng/g.

Vale ressaltar que as características das espécies vegetais, como área de superfície, lipídios e composição podem influenciar nos níveis de compostos que são detectados (XING et al., 2010). A bioacumulação depende do conteúdo lipídico dos tecidos vegetais pois são considerados o principal reservatório de contaminantes orgânicos não iônicos em plantas, principalmente os compostos orgânicos hidrofóbicos fortes (HUANG et al., 2010).

Alguns estudos investigaram o acúmulo de OPFRs nas plantas e constataram que podem se ligar as proteínas e lipídios, e em seguida são absorvidos pelas raízes das plantas. O arroz possui 0,3% de gorduras e o feijão 1,2% (NEPA/UNICAMP, 2006). Os OPFRs, após serem absorvidos pelo solo, são transportados para as partes aéreas das plantas via xilema e via floema (WAN et al., 2017). No entanto, esses poluentes orgânicos podem ser móveis tanto no xilema quanto no floema, consequentemente podem ser transportados longas distâncias nas plantas, acumulando nas partes comestíveis do vegetal e assim aumentando o risco à saúde humana (WAN et al., 2017). O arroz e feijão são duas espécies de plantas temporárias e isso também pode determinar a quantidade de contaminantes que podem ser absorvidas pelos vegetais, pois não absorvem os contaminantes por um longo período.

É importante ressaltar, que o arroz e feijão alimentam a metade da população mundial e são componentes fundamentais na dieta diária dos brasileiros, sendo essenciais na composição da “cesta básica” à população mais carente (FAO, 2004).

Portanto, torna-se imprescindível estudos que determinam a presença desses compostos em arroz e feijão.

4.5.2 AMOSTRAS DE ORIGEM ANIMAL

Nas amostras de leite bovino e composto lácteo foram detectados os compostos EHDPHP e TCIPP, porém não foi possível quantificar os analitos nas matrizes, pois estiveram abaixo do MQL, exceto o composto TIBP (9,06 ng/g) no composto lácteo.

No estudo de Wang; Kannan (2018), nos Estados Unidos, foi encontrado uma média de 0,02 ng/g de EHDPHP e 0,07 ng/g de TDCIPP. No estudo de Chen et al. (2021), na China, o EHDPHP foi um dos mais abundantes dos OPFRs analisados em leite bovino, contribuindo com 34% da média dos compostos. O EHDPHP é amplamente utilizado em embalagens plásticas de alimentos e seu uso foi relatado como a principal fonte de alta contaminação.

Segundo Eulaers et al. (2014), os OPFRs podem ser absorvidos pelos animais pela ingestão de alimentos e água. Porém, ainda há poucos estudos que enfocam na rota de absorção desses compostos pelos mamíferos, sendo a maioria dos estudos em peixes. Além disso, Poma et al. (2018) constataram que os alimentos também têm uma ligação importante com a contaminação durante o processamento industrial e manipulação, no entanto, os autores encontraram maiores níveis de OPFRs em alimentos processados em relação aos alimentos não processados.

As partir da concentrações calculadas para cada OPFRs foi calculada a ingestão diária para homens e mulheres e comparado com os valores de dose de referências, para avaliar os riscos à saúde dos adultos brasileiros.

4.6 ESTIMATIVA DA INGESTÃO DIÁRIA DOS OPFRs POR MEIO DA INGESTÃO DE ALIMENTOS (EDI)

Entre os alimentos de estudo, foram estimados a ingestão de TNBP no arroz 6,34 ng/Kg/dia para os homens e 4,34 ng/Kg/dia para as mulheres. Para o composto TPHP foi estimado uma ingestão de 24,2 ng/Kg/dia para mulheres e 35 ng/Kg/dia para os homens, como mostra a Tabela 7. Os compostos que estavam abaixo do LQM

foram quantificados como a metade do valor de LQM e esse valor foi utilizado para estimar o EDI.

Tabela 7: Estimativa da Ingestão Diária (ng/Kg/dia) dos OPFRs para a população brasileira (homens e mulheres).

	VDR ^a ng/Kg/dia	Homens				Mulheres			
		Arroz	Feijão	Leite bovino	Composto lácteo	Arroz	Feijão	Leite bovino	Composto lácteo
TNBP	24000	6,34	7,33			4,34	4,70		
TBOEP	15000		55				35		
TEHP	35000		3,4				2,2		
TPHP	70000	35				24,2			
TDCIPP	15000								
EHDPHP	-			0,1	0,03			0,1	0,03
TiBP	-								
TCIPP	80000								

Valores de dose de Referências, HOU et al. (2016)^a

Para o feijão, o composto TNBP foi estimado 7,33 ng/Kg/dia para os homens e 4,70 ng/Kg/dia para as mulheres. O composto TBOEP foi estimado 35 ng/Kg/dia para mulheres e 55 ng/Kg/dia para homens. Para o composto TEHP foi estimado 2,2 ng/g/dia para mulheres e 3,4 ng/Kg/dia para homens.

Para o leite bovino, o composto EHDPHP para mulheres foi 0,1 ng/Kg/dia e o mesmo para os homens, 0,1 ng/Kg/dia e para compostos lácteos foi de 0,03 ng/Kg/dia para ambos os sexos.

Entre os alimentos de estudo, o maior valor de EDI correspondeu ao arroz e feijão, similar ao estudo de Zhang et al. (2016) para homens e mulheres. Em contraste, os menores valores de ingestão de OPFRs foi o leite bovino e os compostos lácteos. Entre os compostos, o TPHP e TBOEP corresponderam a maior dose de exposição dos OPFRs.

Para averiguar se essas doses diárias calculadas oferecem algum risco à saúde humana, os valores foram comparados com os valores de dose de referência (VDR) (ng/Kg/dia). Um risco à saúde humana é esperado quando $\sum \text{EDI}$ estiver acima da VDR. A tabela 7 mostra que os valores do presente estudo dos OPFRs detectados foram inferiores aos valores de VDR, e, portanto, os níveis encontrados não representam um risco para a saúde humana. No entanto, mais estudos são considerados necessários, utilizando um maior número de amostras provenientes de diferentes partes do Brasil, e também avaliar a presença destes compostos em outros

alimentos de elevado consumo pelos brasileiros, e fim de realizar uma avaliação de risco mais completa relacionada à exposição humana a OPFRs pela via alimentar.

5. CONCLUSÃO

Com a finalidade de avaliar a presença de retardantes de chama e plastificantes organofosforados em alimentos de origem vegetal e animal há necessidade de desenvolver metodologias que forneçam precisão e exatidão adequados e assim ser possível avaliar a concentração desses contaminantes nos alimentos. O método analítico QuEChERS modificado demonstrou ser eficiente para determinação de OPFRs em leite líquido integral bovino, composto lácteo, arroz e feijão. Foi encontrado uma maior eficiência na limpeza dos extratos utilizando PSA e C18 na etapa de d-SPE, incluindo enxágue dos adsorventes após a d-SPE com acetato de etila. É importante avaliar a curva na matriz, pois se torna necessária para melhores resultados de recuperação. Foram detectados os compostos TNBP, TCIPP, TDCIPP, TPHP, TBOEP, EHDPHP e TEHP e foi possível avaliar a ingestão diária das mulheres e dos homens brasileiros afim de verificar a exposição aos compostos pelos alimentos de estudo. Foi observado um maior valor para o arroz e feijão e os compostos TPHP e TBOEP, porém nenhum composto excedeu os valores de referencia, e portanto as concentrações observadas neste estudo não representam um risco à saúde humana. Contudo, é de suma importância mais estudos relacionados à geração de dados de exposição humana a OPFRs através do consumo de alimentos para que uma avaliação de risco mais completa possa ser realizada , e estes dados podem servir de base para tomadas de decisões políticas que visam a proteção da saúde humana.

6. REFERÊNCIAS

AN, J.; HU, J.; SHANG, Y.; ZHONG, Y.; ZHANG, X.; YU, Z. The cytotoxicity of organophosphate flame retardants on HepG2, A549 and Caco-2 cells. **Journal of Environmental Science and Health**, 51, 980-988, 2016. <https://doi.org/10.1080/10934529.2016.1191819>

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; ŠTAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC international**, 86(2), 412-431, 2003. <https://doi.org/10.1093/jaoac/86.2.412>

ANDRESEN, J. A.; GRUNDMANN, A.; BESTER, K. Organophosphorus flame retardants and plasticisers in surface waters. **Science of the Total Environment**, 332, 155–166, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.04.021>

BAJARD, L.; MELYMUK, L.; BLAHA, L. Prioritization of hazards of novel flame retardants using the mechanistic toxicology information from ToxCast and adverse outcome pathways. **Environmental Sciences Europe**, v. 31, n. 1, p. 14, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12302-019-0195-z>

BARBOSA G, F.; ARF, O.; NASCIMENTO, M. S.; BUZETTI, S.; FREDDI, O. S. Nitrogênio em cobertura e molibdênio foliar no feijoeiro de inverno. **Acta Scientiarum. Agronomy**, 32:117- 123, 2010. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v32i1.1605>

BAYEN, S.; OBBARD, J. P.; THOMAS, G. O. Chlorinated paraffins: A review of analysis and environmental occurrence. **Environment International**, 32:915-29, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.05.009>

BEHL, M.; HSIEH, J. H.; SHAFER, T. J.; MUNDY, W. R.; RICE, J. R.; BOYD, W. A.; FREEDMAN, J. H.; HUNTER, E. S.; JAREMA, K. A.; PADILLA, S.; TICE, R. R. Use of

alternative assays to identify and prioritize organophosphorus flame retardants for potential developmental and neurotoxicity. **Neurotoxicology and Teratology**, 52, 181-93, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2015.09.003>

BEKELE, T. G.; ZHAO, H.; YANG, J.; CHEGEN, R. G.; CHEN, J.; MEKONEN, S.; QADEER, A. A review of environmental occurrence, analysis, bioaccumulation, and toxicity of organophosphate esters. **Environmental Science and Pollution Research**, 28 (36), 49507- 49528, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-15861-8>

CAO, Z.; YU, G.; CHEN, Y.; LIU, C.; LIU, K.; ZHANG, T.; WANG, B.; DENG, S.; HUANG, J. Mechanisms influencing the BFR distribution patterns in office dust and implications for estimating human exposure. **Journal of hazardous materials**, 252, 11-18, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.02.043>

CHEN, Y.; FANG, J.; REN, L.; FAN, R.; ZHANG, J.; LIU, G.; ZHOU, L.; CHEN, D.; YU, Y.; LU, S. Urinary metabolites of organophosphate esters in children in South China: Concentrations, profiles and estimated daily intake. **Environmental Pollution**, 235, 358-364, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.092>

CHEN, M.; JIANG, J.; GAN, Z.; YAN, Y.; DING, S.; SU, S.; BAO, X. Grain Size distribution and exposure evaluation of organophosphorus and brominated flame retardants in indoor and outdoor dust and PM10 from Chengdu, China. **Journal of Hazardous Materials** 365, 280-288, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.10.082>

CHUPEAU, Z.; BONVALLOT, N.; MERCIER, F.; LE BOT, B.; CHEVRIER, C.; GLORENNEC, P. Organophosphorus flame retardants: a global review of indoor contamination and human exposure in Europe and epidemiological evidence. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 17(18), 6713, 2020.

CRISTALE, J.; KATSOYIANNIS, A.; SWEETMAN, A. J.; JONES, K. C.; LACORTE, S. Occurrence and risk assessment of organophosphorus and brominated flame

retardants in the River Aire (UK). **Environmental Pollution**, 179,194–200, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.04.001>

CRISTALE, J.; SANTOS, I. O.; DE ARAGÃO UMBUZEIRO; G.; FAGNANI, E. Occurrence and risk assessment of organophosphate esters in urban rivers from Piracicaba watershed (Brazil). **Environmental Science and Pollution Research**, 1-12, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10150-2>

DING, J.; DENG, T.; XU, M.; WANG, S.; YANG, F. Residuals of organophosphate esters in foodstuffs and implication for human exposure. **Environmental Pollution**, 233, 986–991, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.09.092>

DISHAW, L. V.; HUNTER, D. L.; PADNOS, B.; PADILLA, S.; STAPLETON, H. M. Developmental exposure to organophosphate flame retardants elicits overt toxicity and alters behavior in early life stage zebrafish (*danio rerio*). **Toxicological Sciences**, 142 (2), 445-454, 2014.

DU, Z.; WANG, G.; GAO, S.; WANG, Z. Aryl organophosphate flame retardants induced cardiotoxicity during zebrafish embryogenesis: by disturbing expression of the transcriptional regulators. **Aquatic Toxicology**, 161, 25-32, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.01.027>

DU, Z.; ZHANG, Y.; WANG, G.; PENG, J.; WANG, Z.; GAO, S. TPhP exposure disturbs carbohydrate metabolism, lipid metabolism, and the DNA damage repair system in zebrafish liver. **Scientific Reports**, 6 (11), 1771–1778, 2016. DOI: 10.1038/srep21827

ERNEY, D. R.; GILLESPIE, A. M.; GILVYDIS, D. M.; POOLE, C. F. Explanation of the matrix-induced chromatographic response enhancement of organophosphorus pesticides during open tubular column gas chromatography with splitless or hot on-column injection and flame photometric detection. **Journal of Chromatography A**, 638(1), 57-63, 1993. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(93\)85007-T](https://doi.org/10.1016/0021-9673(93)85007-T)

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Rice Market monitor**, 2018. <http://www.fao.org/economic/RMM>

FROMME, H.; BECHER, G.; HILGER, B.; VÖLKE, W. Brominated flame retardants exposure and risk assessment for the general population. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, 219, 1-23, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2015.08.004>

GALUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z.; NAMIEŚNIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 50, 78-84, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.04.010>

GIULIVO, M.; CAPRI, E.; KALOGIANNI, E.; MILACIC, R.; MAJONE, B.; FERRARI, F.; ELJARRAT, E.; BARCELO, D. Occurrence of halogenated and organophosphate flame retardants in sediment and fish samples from three European river basins. **Science of the Total Environment**, 586, 782–791, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.056>

GUO, X. D.; MU, T. N.; XIAN, Y. P.; LUO, D. H.; WANG, C. Ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for the rapid simultaneous analysis of nine organophosphate esters in milk powder. **Food Chemistry**, 196, 673–681, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.100>

GRAVEL, S.; LAVOUE, J.; BAKHIYI, B.; DIAMOND, M. L.; JANTUNEN, L. M.; LAVOIE, J.; ROBERGE, B.; VERNER, M. A.; ZAYED, J.; LABRECHE, F. Halogenated flame retardants and organophosphate esters in the air of electronic waste recycling facilities: evidence of high concentrations and multiple exposures. **Environment International**, 128, 244–253, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.04.027>

GREAVES, A. K.; LETCHER, R. J.; CHEN, D.; MCGOLDRICK, D. J.; GAUTHIER, L. T.; BACKUS, S. M. Retrospective analysis of organophosphate flame retardants in herring gull eggs and relation to the aquatic food web in the Laurentian Great Lakes of

North America. **Environmental Research**, 150, 255–263, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.06.006>

HAJŠLOVÁ, J.; HOLADOVA, K.; KOCOUREK, V.; POUSTKA, J.; GODULA, M.; CUHRA, P.; KEMPNÝ, M. Matrix-induced effects: a critical point in the gas chromatographic analysis of pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, 800(2), 283-295, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)01145-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)01145-X)

HAJŠLOVÁ, J.; ZROSTLIKOVA, J. Matrix effects in (ultra) trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices. **Journal of Chromatography A**, 1000, 1-2, 181-197, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00539-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00539-9)

HE, C.; ENGLISH, K.; BADUEL, C.; THAI, P.; JAGALS, P.; WARE, R. S.; LI, Y.; WANG, X.; SLY, P. D.; MUELLER, J. F. Concentrations of organophosphate flame retardants and plasticizers in urine from young children in Queensland, Australia and associations with environmental and behavioural factors. **Environmental research**, 164, 262-270, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.02.040>

HE, C.; WANG, X., TANG, S.; THAI, P.; LI, Z.; BADUEL, C.; MUELLER, J. F. Concentrations Of organophosphate esters and their specific metabolites in food in Southeast Queensland, Australia: is dietary exposure an important pathway of organophosphate esters and their metabolites? **Environmental Science & Technology**, 52, 12765–12773, 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b03043>

HOFFMAN, K.; GARANTZIOTIS, S.; BIRNBAUM, L. S.; STAPLETON, H. M. Monitoring indoor exposure to organophosphate flame retardants: hand wipes and house dust. **Environmental Health Perspectives**, 123, 160–165, 2015. <https://doi.org/10.1289/ehp.1408669>

HOLSTEGE, D. M.; SCHARBERG, D. L.; TOR, E. R.; HART, L. C.; GALEY, F. D. A rapid multiresidue screen for organophosphorus, organochlorine, and N-methyl carbamate insecticides in plant and animal tissues. **Journal of AOAC International**, 77(5), 1263-1274, 1994. <https://doi.org/10.1093/jaoac/77.5.1263>

HUANG, H. L.; ZHANG, S. Z.; CHRISTIE, P.; WANG, S.; XIE, M. Behavior of Decabromodiphenyl Ether (BDE-209) in the Soil-Plant System: Uptake, Translocation, and Metabolism in Plants and Dissipation in Soil. **Environ. Sci. Technol**, 44 (2), 663–667, 2010. <https://doi.org/10.1021/es901860r>

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, and Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. "Pesquisa de orçamentos familiares 2017-2018: análise do consumo alimentar pessoal no Brasil." (2020).

ICH: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, in Q2(R1). ICH Harmonised Tripartite Guideline: London, 2005.

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. Orientação sobre validação de métodos analíticos. Abril, 2020. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?torganismo=calibensaio.

IQBAL, M.; SYED, J. H.; KATSOYIANNIS, A.; MALIK, R. N.; FAROOQI, A.; BUTT, A.; LI, J.; ZHANG, G.; CINCINELLI, A.; JONES, K.C. Legacy And emerging flame retardants (FRs) in the freshwater ecosystem: a review. **Environmental Research**, 152, 26–42, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.09.024>

ISALES, G. M.; HIPSZER, R. A.; RAFTERY, T. D.; CHEN, A.; STAPLETON, H. M.; VOLZ, D. C. Triphenyl phosphate-induced developmental toxicity in zebrafish: potential role of the retinoic acid receptor. **Aquatic Toxicology**, 161, 221–230, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.02.009>

JAREMA, K. A.; HUNTER, D. L.; SHAFFER, R. M.; BEHL, M.; PADILLA, S. Acute and developmental behavioral effects of flame retardants and related chemicals in zebrafish. **Neurotoxicology and Teratology**, 52, 194–209, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2015.08.010>

JOHNSEN, L. G.; SKOU, P. B.; KHAKIMOV, B.; BRO, R. Gas chromatography–mass spectrometry data processing made easy. **Journal of Chromatography a**, 1503, 57–64, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.04.052>

KANZA, M. M.; SAMEEN, A.; KHAN, M. U.; SHARIATI, M. A.; HRISTOVA, V. K. Impact of cheese whey protein on growth performance of broiler: An approach of cheese utilization in poultry feed. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, 6(4), 1117-1120, 2017. DOI: 10.15414/jmbfs.2017.6.4.1117-1120

KIM, S.; JUNG, J.; LEE, I.; JUNG, D.; YOUN, H.; CHOI, K. Thyroid disruption by triphenyl phosphate, an organophosphate flame retardant, in zebrafish (*Danio rerio*) embryos/larvae, and in GH3 and FRTL-5 cell lines. **Aquatic Toxicology**, 160, 188–196, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.01.016>

KIM, L.; LEE, D.; CHO, H. K.; CHOI, S. D. Review of the QuEChERS method for the analysis of organic pollutants: Persistent organic pollutants, polycyclic aromatic hydrocarbons, and pharmaceuticals. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, 22, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2019.e00063>

LAI, N. L. S.; KWOK, K. Y.; WANG, X. H.; YAMASHITA, N.; LIU, G.; LEUNG, K. M. Y.; LAM, P. K. S.; LAM, J. C. W. Assessment of organophosphorus flame retardants and plasticizers in aquatic environments of China (Pearl River Delta, South China Sea, Yellow River Estuary) and Japan (Tokyo Bay). **Journal of Hazardous Materials** 371,288–294, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.03.029>

LAOUTID, F.; BONNAUD, L.; ALEXANDRE, M.; LOPEZ-CUESTA, J. M.; DUBOIS, P. New prospects in flame retardant polymer materials: from fundamentals to nanocomposites. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, 63(3), 100-125, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2008.09.002>

LEE, S.; CHO, H. J.; CHOI, W.; MOON, H. B. Organophosphate flame retardants (OPFRs) in water and sediment: occurrence, distribution, and hotspots of contamination of Lake Shihwa, Korea. **Marine Pollution Bulletin**, 130,105–112, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.03.009>

LEHOTAY, S. J.; ZWEIGENBAUM, J. QuEChERS Sample Preparation Approach for Mass Spectrometric Analysis of Pesticide Residues in Foods. **Humana Press, Totowa**, NJ, 65-91, 2011. DOI: 10.1007/978-1-61779-136-9_4

LI, J.; YU, N.; ZHANG, B.; JIN, L.; LI, M.; HU, M.; ZHANG, X.; WEI, S.; YU, H. Occurrence of organophosphate flame retardants in drinking water from China. **Water research**, 54, 53-61, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.01.031>

LI, J.; ZHAO, L.; LETCHER, R. J.; ZHANG, Y.; JIAN, K.; ZHANG, J.; SU, G. A review on organophosphate Ester (OPE) flame retardants and plasticizers in foodstuffs: Levels, distribution, human dietary exposure, and future directions. **Environment International** 127, 35–51, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.03.009>

LI, H.; SU, G. Y.; ZOU, M.; YU, L. Q.; LETCHER, R. J.; YU, H. X.; GIESY, J. P.; ZHOU, B.; LIU, C. Effects of tris (1,3-dichloro-2-propyl) phosphate on growth, reproduction, and gene transcription of *Daphnia magna* at environmentally relevant concentrations. **Environmental Science e Technology**, 49, 12975–12983, 2015. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03294>

LIU, L.; HE, K.; HITES, R. A.; SALAMOVA, A. Hair and Nails as Noninvasive Biomarkers of Human Exposure to Brominated and Organophosphate Flame Retardants. **Environmental Science e Technology**. 50 (6), 3065–3073, 2016. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05073>

LIU, X.; JI, K.; JO, A.; MOON, H.B.; CHOI, K. Effects of TDCPP or TPP on gene transcriptions and hormones of HPG axis, and their consequences on reproduction in adult zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**, 134, 104–111, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.03.013>

LIU, Y. E.; LUO, X. J.; HUANG, L. Q.; ZENG, Y. H.; MAI, B. X. Organophosphorus flame retardants in fish from Rivers in the Pearl River Delta, South China. **Science of The Total Environment**, 663, 125-132, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.344>

LIU, Y. E.; HUANG, L. Q.; LUO, X. J.; TAN, X. X.; HUANG, C. C.; CORELLA, P. Z.; MAI, B. X. Determination of organophosphorus flame retardants in fish by freezing-lipid precipitation, solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1532, 68-73, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.12.001>

MARKLUND, A.; ANDERSSON, B.; HAGLUND, P. Screening of organophosphorus compounds and their distribution in various indoor environments. **Chemosphere**, 53, 1137-1146, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00666-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00666-0)

MARSTON, A. Role of advances in chromatographic techniques in phytochemistry. **Phytochemistry**, 68, 22-24, 2785-2797, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.08.004>

MARTINS, Priscila. Uso de aditivos não tóxicos como retardantes de chama em ABS. São Paulo, 2013. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/3/3133/tde-26062014220239/publico/Dissertacao_PriscilaAMartins.pdf

MAŠTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S. J. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, 1040 (2), 259-272, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.04.017>

MCGEE, S. P.; KONSTANTINOV, A.; STAPLETON, H. M.; VOLZ, D. C. Aryl phosphate esters within a major PentaBDE replacement product induce cardiotoxicity in developing zebrafish embryos: potential role of the aryl hydrocarbon receptor. **Toxicological Sciences**, 133, 144–156, 2013. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kft020>

MEJIA, D.; LEWIS, B.; JONES, A. L. Phaseolus bean: post-harvest operations. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**: Rome, Italy, 1999. Available: <http://www.fao.org/3/a-av015e.pdf>.

MEYER, J.; BESTER, K. Organophosphate flame retardants and plasticisers in wastewater treatment plants. **Journal of Environmental Monitoring**, 6.7: 599-605, 2004. <https://doi.org/10.1039/B403206C>

MITRO, S. D.; DODSON, R. E.; SINGLA, V.; ADAMKIEWICZ, G.; ELMI, A. F.; TILLY M. K.; ZOTA, A. R. Consumer product chemicals in indoor dust: a quantitative meta-analysis of US studies. **Environmental Science & Technology**, 50:10661–10672, 2016. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b02023>

MOSER, V. C.; PHILLIPS, P. M.; HEDGE, J. M.; MCDANIEL, K. L. Neurotoxicological and thyroid evaluations of rats developmentally exposed to tris (1,3-dichloro-2-propyl) phosphate (TDCIPP) and tris (2-chloro-2-ethyl) phosphate (TCEP). **Neurotoxicology and Teratology**, 52, 236–247, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2015.08.004>

MUGHAL, B. B.; DEMENEIX, B. A. Flame retardants and increased risk of thyroid cancer. **Nature Reviews Endocrinology**, 13, 627–628, 2017. <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2017.123>

MUTHAYYA, S.; SUGIMOTO, J. D.; MONTGOMERY, S.; MABERLY, G. F. An overview of global rice production, supply, trade, and consumption. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1324(1), 7-14, 2014. <https://doi.org/10.1111/nyas.12540>

NASCIMENTO, R. F. D.; LIMA, A. C. A. D.; BARBOSA, P. G. A.; SILVA, V. P. A. D. Cromatografia gasosa: aspectos teóricos e práticos. Repositório Institucional UFC: 2018. <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/39260>

NATA. Technical Note 17: Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods. **National Association of Testing Authorities**, Australia, 2013.

NEPA/UNICAMP (NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO/UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS). Tabela brasileira de FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS). Rice is life, 2004. Italy. doi: 10.1016/j.foodchem.2003.10.011.composição de alimentos – TACO, Versão II. 2.ed. Campinas, 2006. 114p.

PANG, L.; YANG, H.; YANG, P.; ZHANG, H.; ZHAO, J. Trace determination of organophosphate esters in white wine, red wine, and beer samples using dispersive liquid-liquid microextraction combined with ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, 229, 445–451, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.103>

PANTELAKI, I.; VOUTSA, D. Organophosphate flame retardants (OPFRs): A review on analytical methods and occurrence in wastewater and aquatic environment. **Science of the Total Environment**, 649, 247-263, 2019.

PERSSON, J.; WANG, T.; HAGBERG, J. Organophosphate flame retardants and plasticizers in indoor dust, air and window wipes in newly built low-energy preschools. **Science of the Total Environment**, 628, 159-168, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.053>

PESTANA, C. R.; BORGES, K. B.; FONSECA, P. D.; OLIVEIRA, D. P. D. Risco ambiental da aplicação de éteres de difenilas polibromadas como retardantes de chama. **Revista Brasileira de Toxicologia**, 21(2), 41-48, 2008.

PIERONI, M.C.; LEONEL, J.; FILLMANN, G. Brominated flame retardants: a review. **Química Nova**, 40, 317–326, 2017. <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20160176>

PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L.; SILVÉRIO, F. O. Matrix effect in pesticide quantification by gas chromatography. **Química Nova**, 32(4), 987-995, 2009. DOI: [10.1590/S0100-40422009000400030](https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000400030)

PIHLSTRÖM, T.; BLOMKVIST, G.; FRIMAN, P.; PAGARD, U.; ÖSTERDAHL, B. G. Analysis of pesticide residues in fruit and vegetables with ethyl acetate extraction using gas and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. **Analytical and bioanalytical chemistry**, 389(6), 1773-1789, 2007. DOI: [10.1007/s00216-007-1425-6](https://doi.org/10.1007/s00216-007-1425-6)

POMA, G.; GLYNN, A.; MALARVANNAN, G.; COVACI, A.; DARNERUD, P. O. Dietary intake of phosphorus flame retardants (PFRs) using swedish food market basket

estimations. **Food and Chemical Toxicology**, 100, 1–7, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.12.011>

POMA, G.; SALES, C.; BRUYLAND, B.; CHRISTIA, C.; GOSCINNY, S.; VAN LOCO, J.; COVACI, A. Occurrence of organophosphorus flame retardants and plasticizers (PFRs) in Belgian foodstuffs and estimation of the dietary exposure of the adult population. **Environmental Science & Technology**, 52 (4), 2331–2338, 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b06395>

PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS: um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, São Paulo, 32, 6, 1620-1634, 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000600046>.

PRESTON, E. V.; MCCLEAN, M. D.; CLAUS HENN, B.; STAPLETON, H. M.; BRAVERMAN, L. E.; PEARCE, E. N.; MAKEY, C. M.; WEBSTER, T. F. Associations between urinary diphenyl phosphate and thyroid function. **Environment International**, 101, 158–164, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.01.020>

QUINTANA, G. O.; FAGNANI, E.; CANDELLO, F. P.; GUIMARÃES, J. R. The Dichromate Method versus the Photoelectrochemical Method: the Synergistic Influence of Turbidity and Chlorides on Chemical Oxygen Demand Analysis. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 29, 490-498, 2018. <http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20170161>

REICHERT, B.; PEREIRA NUNES, M. G.; PIZZUTTI, I. R.; COSTABEBER, I. H.; FONTANA, M. Z.; JÄNICH, B. D.; CHIM, J. F. Pesticide residues determination in common bean using an optimized QuEChERS approach followed by solvent exchange and GC–MS/MS analysis. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 100 (6), 2425-2434, 2020. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10258>

ROMO-PALAFOX, M. J.; POMERANZ, J. L.; HARRIS, J. L. Infant formula and toddler milk marketing and caregiver's provision to young children. *Maternal and Child Nutrition*, v. 16, n. 3, p. 1-11, 2020

SALVADOR, I. M.; FRENICH, A. G.; GONZALEZ, F. E.; VIDAL, J. M. Determination of organophosphorus pesticides in vegetables by GC with pulsed flame-photometric detection, and confirmation by MS. **Chromatographia**, 64 (11-12), 667-672, 2006. DOI: 10.1365/s10337-006-0104-7 0009-5893/06/12

SARODE, A. R.; KALYANKAR, S. D.; DEOSARKAR, S. S.; KHEDKAR, C. D.; PAWSHE, R. D. Milk: Role in the diet. Reference Module in Food Science. In **Encyclopedia of Food and Health** - Oxford, UK: Academic Press, 736–740, 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00462-1>

SCHANG, G.; ROBAIRE, B.; HALES, B. F. Organophosphate flame retardants act as endocrine-disrupting chemicals in ma-10 mouse tumor leydig cells. **Toxicological Sciences**, 150 (2), 499–509, 2016.

SCHARTEL, B. Phosphorus-based flame retardancy mechanisms-old hat or a starting point for future development? **Materials**, 3, 10, 4710-4745, 2010. <https://doi.org/10.3390/ma3104710>

SCHMIDT, C. W. In search of “just right”: the challenge of regulating arsenic in rice, **Environmental Health Perspectives**, 123, A16–19, 2015. <https://doi.org/10.1289/ehp.123-A16>

SHA, B.; DAHLBERG, A. K.; WIBERG, K.; AHRENS, L. Fluorotelomer alcohols (FTOHs), brominated flame retardants (BFRs), organophosphorus flame retardants (OPFRs) and cyclic volatile methyl siloxanes (cVMSs) in indoor air from occupational and home environments. **Environmental Pollution**, 241, 319–330, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.04.032>

SHEN, J.; ZHANG, Y.; YU, N.; CRUMP, D.; LI, J.; SU, H.; LETCHER, R. J.; SU, J. Organophosphate ester, 2-ethylhexyl diphenyl phosphate (EHDPP), elicits cytotoxic and transcriptomic effects in chicken embryonic hepatocytes and its biotransformation profile compared to humans. **Environmental Science & Technology**, 53, 2151–2160, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b06246>

SINGH, H.; JAIN, A. K. Ignition, combustion, toxicity, and fire retardancy of polyurethane foams: a comprehensive review. **Journal of Applied Polymer Science**, 111, 2, 1115-1143, 2008. <https://doi.org/10.1002/app.29131>

SIQUEIRA, K. B. O mercado consumidor de leite e derivados. **Circular Técnica Embrapa**, 120, 1-17, 2019.

SOUSA, J. S.; CASTRO, J.; ALBUQUERQUE ANDRADE J. R. C.; LIMA, G.; LIMA, C, G.; MILHOME, L. K.; NASCIMENTO, M. A. L. Evaluation of an analytical methodology using QuEChERS and GC-SQ/MS for the investigation of the level of pesticide residues in Brazilian melons. **Food Chemistry**, 141, 2675-2681, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.027>

SUN, L.; XU, W.; PENG, T.; CHEN, H.; REN, L.; TAN, H.; XIAO, D.; QIAN, H.; FU, Z. Developmental exposure of zebrafish larvae to organophosphate flame retardants causes neurotoxicity. **Neurotoxicology and teratology**, 55, 16-22, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2016.03.003>

SUNDKVIST, A. M.; OLOFSSON, U.; HAGLUND, P. Organophosphorus flame retardants and plasticizers in marine and freshwater biota and in human milk. **Journal of Environmental Monitoring**. 12 (4), 943–951, 2010. <https://doi.org/10.1039/b921910b>

UENO, E.; OSHIMA, H.; SAITO, I.; MATSUMOTO, H.; YOSHIMURA, Y.; NAKAZAWA H. Multiresidue Analysis of Pesticides in Vegetables and Fruits by Gas Chromatography/Mass Spectrometry after Gel Permeation Chromatography and

Graphitized Carbon Column Cleanup. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, 87:1003, 2004. <https://doi.org/10.1093/jaoac/87.4.1003>

UNEP - United Nations Environment Programme
<http://chm.pops.int/TheConvention/ThePOPs/TheNewPOPs/tabid/2511/Default.aspx>
 (2017).

US EPA, 2016. Fact Sheet: Assessing Risks from Flame Retardants. Available online. <https://www.epa.gov/assessing-and-managing-chemicals-under-tsca/fact-sheet-assessing-risks-flame-retardants>.

TA, N.; LI, C.; FANG, Y.; LIU, H.; LIN, B.; JIN, H.; TIAN, L.; ZHANG, H.; ZHANG, W.; XI, Z. Toxicity of TDCPP and TCEP on PC12 cell: changes in CAMKII, GAP43, tubulin and NF-H gene and protein levels. **Toxicology Letters**, 227, 164–171, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.03.023>

TRABALÓN, L.; VILAVERT, L.; DOMINGO, J. L.; POCURULL, E.; BORRULL, F.; NADAL, M. Human exposure to brominated flame retardants through the consumption of fish and shellfish in Tarragona County (Catalonia, Spain). **Food and Chemical Toxicology**, 104, 48-56, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.11.022>

VAN DER VEEN, I.; DE BOER, J. Phosphorus flame retardants: Properties, production, environmental occurrence, toxicity and analysis. **Chemosphere**, 88 (10), 1119–1153, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.03.067>

VILELA, D.; RESENDE, J. C. D.; LEITE, J. B.; ALVES, E. A evolução do leite no Brasil em cinco décadas. **Revista de Política Agrícola**, 26(1), 5-24, 2017.

WAN, W.; ZHANG, S.; HUANG, H.; WU, T. Occurrence and distribution of organophosphorus esters in soils and wheat plants in a plastic waste treatment area in China. **Environmental Pollution**, 214, 349-353, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.04.038>

WAN, W.; HUANG, H.; LV, J.; HAN, R.; ZHANG, S. Uptake, Translocation, and Biotransformation of Organophosphorus Esters in Wheat (*Triticum aestivum* L.). **Environ. Sci. Technol.** 2017, 51 (23), 13649–13658.

<https://doi.org/10.1021/acs.est.7b01758>

WANG, Q.; LAM, J.C.W.; MAN, Y. C.; LAI, N. L. S.; KWOK, K. Y.; GUO, Y. Y.; LAM, P. K.; ZHOU, B. Bioconcentration, metabolism and neurotoxicity of the organophosphorus flame retardant 1,3-dichloro 2-propyl phosphate (TDCPP) to Zebrafish. **Aquatic Toxicology**, 158, 108-115, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.11.001>

WANG, Y.; KANNAN, K. Concentrations and dietary exposure to organophosphate esters in foodstuffs from Albany, New York, United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 66, 13525–13532, 2018.

<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06114>

WANG, Y.; SUN, H. W.; ZHU, H. K.; YAO, Y. M.; CHEN, H.; REN, C.; WU, F. C.; KANNAN, K. Occurrence and distribution of organophosphate flame retardants (OPFRs) in soil and outdoor settled dust from a multi-waste recycling area in China. **Science of the Total Environment**, 625, 1056–1064, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.013>

WANG, F.; YUAN, Q. H.; SHI, L.; QIAN, Q.; LIU, W. G.; KUANG, B. G.; JIA, S. R. A large-scale field study of transgene flow from cultivated rice (*Oryza sativa*) to common wild rice (*O. rufipogon*) and barnyard grass (*Echinochloa crusgalli*). **Plant Biotechnology Journal**, 4(6), 667-676, 2006.

<https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2006.00210.x>

WANG, Y.; YAO, Y.; LI, W.; ZHU, H.; WANG, L.; SUN, H.; KANNAN, K. A nationwide survey of 19 organophosphate esters in soils from China: spatial distribution and hazard assessment. **Science of the Total Environment**, 671, 528–535, 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.335>

WEI, G. L.; LI, D. Q.; ZHUO, M. N.; LIAO, Y. S.; XIE, Z. Y.; GUO, T. L.; LI, J. J.; ZHANG, S. Y.; LIANG, Z. Q. Organophosphorus flame retardants and plasticizers: sources, occurrence toxicity and human exposure. **Environmental Pollution**, 196, 29–46, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.09.012>

World Health Organization (WHO). "Flame retardants: a general introduction." **Environmental Health Criteria** 192, 1997. Link <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc192.htm>

WU, Z.; LIU, J.; PENG, Y. QuEChERS purification prior to stable isotope dilution-ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry to determine organophosphate esters of trace amounts in dairy products. **Analytical Methods**, 9(15), 2290-2298, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1039/C6AY03162E>

YADAV, I.C.; DEVI, N.L.; SINGH, V.K.; LI, J.; ZHANG, G. Measurement of legacy and emerging flame retardants in indoor dust from a rural village (Kopawa) in Nepal: implication for source apportionment and health risk assessment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 168, 304–314, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.10.089>

ZHA, D.; LI, Y.; YANG, C.; YAO, C. Assessment of organophosphate flame retardants in surface water and sediment from a freshwater environment (Yangtze River, China). **Environmental monitoring and assessment**, 190(4), 222, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10661-018-6587-5>

ZHANG, H.; FENG, X.; LARSEN, T.; QIU, G.; VOGT, R. D. In inland China rice, rather than fish, is the major pathway for methylmercury exposure. **Environmental Health Perspectives**, 118, 1183–1188, 2010. <https://doi.org/10.1289/ehp.1001915>

ZHANG, Z.; LIN, G.; LIN, T.; ZHANG, R.; JIN, L.; DI, Y. Occurrence, behavior, and fate of organophosphate esters (OPFRs) in subtropical paddy field environment: A case

study in Nanning City of South China. **Environmental Pollution**, 267, 115675, 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115675>

ZHANG, X.; ZOU, W.; MU, L.; CHEN, Y.; REN, C.; HU, X.; ZHOU, Q. Rice ingestion is a major pathway for human exposure to organophosphate flame retardants (OPFRs) in China. **Journal of Hazardous Materials**, 318, 686–693, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.07.055>

ZHAO, L.; JIAN, K.; SU, H.; ZHANG, Y.; LI, J.; LETCHER, R. J.; SU, G. Organophosphate esters (OPFRs) in Chinese foodstuffs: Dietary intake estimation via a market basket method, and suspect screening using high resolution mass spectrometry. **Environment International**, 128, 343–352, 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.04.055>

7. ANEXO I

Resultados obtidos nos testes t pareado em relação as curvas das amostras de arroz, feijão, leite integral bovino e composto lácteo (intervalo de confiança de 95%).

		Arroz		Feijão		Leite		Composto Lácteo	
Composto	Curvas	$t_{\text{calculado}}$	$t_{\text{crítico}}$	$t_{\text{calculado}}$	$t_{\text{crítico}}$	$t_{\text{calculado}}$	$t_{\text{crítico}}$	$t_{\text{calculado}}$	$t_{\text{crítico}}$
TIBP	CS	3,7	2,7	3,5	2,7	4,1	2,7	3,9	2,7
TnBP	CEBP	3,4	2,7	3	2,7	2,8	2,7	2,7	2,7
	CS	-	-	-	-	-	-	-	-
TCEP	CEBP	1,3	2,7	0,08	2,7	1,3	2,7	0,7	2,7
	CS	1,6	2,7	0,1	2,7	0,5	2,7	0,2	2,7
TCIPP	CEBP	1,3	2,7	2	2,7	0,6	3,1	0,7	2,7
	CS	0,3	2,7	1,1	2,7	0,1	3,1	0,03	2,7
TDCIPP	CEBP	2,5	2,7	1,8	2,7	-	-	-	-
	CS	5,5	4,3	3	4,3	-	-	-	-
TPHP	CEBP	8,1	2,7	1,3	2,7	5,5	2,7	2,2	2,7
	CS	6,3	2,7	0,2	2,7	4,8	2,7	13,8	2,7
TBOEP	CEBP	-	-	-	-	-	-	-	-
	CS	2,4	2,7	5,9	2,7	-	-	-	-
EHDPHP	CEBP	1,7	2,7	3	2,7	3,2	2,7	7,8	2,7
	CS	4,5	2,7	5,7	2,7	1,6	2,7	2,0	2,7
TEHP	CEBP	-	-	-	-	-	-	-	-
	CS	4,4	2,7	6,7	2,7	1,6	4,3	25,2	3,1
TMPP	CEBP	1,6	3,1	1,3	3,1	0,9	3,1	5,1	3,1
	SC	1,2	3,1	1,0	3,1	0,7	3,1	17,5	3,1

- Não foi possível realizar o test t , pois não foi obtida uma boa linearidade da CS, CEBP ou CEM

Dados em negrito indicam que houve diferença significativa