Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Instituto de Química
Programa de Pós Graduação em Química – Mestrado e Doutorado

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE ANÁLISE DE BISFENOL A EM AMOSTRAS DE SALIVA HUMANA POR CG-EM

Tiago Albano Montagner

Orientadora: Profa. Dra. Marcia Helena de Rizzo da Matta

Coorientadora: Profa. Dra. Nilva Ré

Campo Grande – 2013

Unidade XI – Instituto de Química – UFMS
Cidade Universitária, s/n *Caixa Postal 549 Fone/Fax 067xx 3345-7009 Fone 067xx 3345-7010
79070-900 * Campo Grande (MS) *
http://www.ufms.br e-mail: pgquimica.propp@ufms.br

Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Instituto de Química
Programa de Pós Graduação em Química – Mestrado e Doutorado

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE ANÁLISE DE BISFENOL A EM AMOSTRAS DE SALIVA HUMANA POR CG-EM

Tiago Albano Montagner

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química – Nível de Mestrado – da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul para obtenção do título de Mestre em Química (área de concentração: Química.

Orientadora: Profa. Dra. Marcia Helena de Rizzo da Matta
Coorientadora: Profa. Dra. Nilva Ré

Campo Grande – 2013

Unidade XI – Instituto de Química – UFMS
Cidade Universitária, s/n *Caixa Postal 549 Fone/Fax 067xx 3345-7009 Fone 067xx 3345-7010
79070-900 * Campo Grande (MS) *
http://www.ufms.br e-mail: pgquimica.propp@ufms.br

TERMO DE DEFESA

(X) – Dissertação ( ) – Tese ( ) – Qualificação

ALUNO
Tiago Albano Montagner

TÍTULO DO TRABALHO
Desenvolvimento e validação de método de análise de Bisfenol A em amostras de saliva humana por CG-EM/EM

Dissertação de Mestrado em Química/UFMS submetida à Comissão Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Química – Cursos de Mestrado e Doutorado/PPGQ, **(Resolução nº 115/2013)**, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos necessários para titulação no curso.

COMISSÃO EXAMINADORA		
NOME	**INSTITUIÇÃO DE ENSINO**	**ASSINATURA**
Marcia Helena de Rizzo da Matta	UFMS	
João Batista Gomes de Souza	UFGD	
Maria Lucia Ribeiro	UFMS	

Campo Grande, 30 de julho de 2013

À minha família e aos meus amigos pelo apoio incondicional em todos os momentos.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Profª Drª Marcia Helena de Rizzo da Matta, pela amizade, compreensão e por compartilhar seu conhecimento na orientação desta dissertação.

À minha mãe e meu irmão, por me incentivarem o tempo todo.

Aos meus filhos e esposa, pelo amor e carinho de todos os dias.

Aos meus colegas e amigos, pela troca de conhecimentos, experiências e principalmente pela amizade.

À Profª Drª Nilva Ré, pela ajuda e pela coorientação deste trabalho.

À Drª Suely Flores Grisoste Barbosa, cirurgiã-dentista, pelo apoio quanto às informações das resinas dentárias, cessão das mesmas e feitio das restaurações necessárias a esta pesquisa.

Ao Luiz Leonardo, pela atenção e ajuda no equipamento.

Aos professores e técnicos do Departamento de Química, que sempre me ajudaram no decorrer do trabalho.

À Banca Examinadora, pela atenção despendida na avaliação desta pesquisa e pelas sugestões muito benvindas.

À CAPES/REUNI (Coordenação de Desenvolvimento de Pessoa de Nível Superior/Reestruturação e Expansão das Universidades Federais) pela bolsa concedida.

A todos,

Muito Obrigado!

"O que os homens realmente querem não são conhecimentos, mas sim certezas."

Bertrand Russel

RESUMO

O Bisfenol A (BFA) é um monômero, formado por dois anéis fenólicos, empregado na produção de plástico policarbonato e resinas epóxi. Estudos revelaram que o BFA age nos organismos vivos com efeitos de disrupção endócrina, como um xenobiótico com ação estrogênica, provocando aumento da incidência de câncer de mama, queda da quantidade de esperma, diminuição da fertilidade, defeitos congênitos secundários à exposição fetal e outras alterações. Adicionalmente, também foi comprovado que o BFA escapa das resinas utilizadas no tratamento dentário para a saliva. Utilizando-se como técnica de detecção e quantificação a Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM), desenvolveu-se o método de análise neste trabalho e validou-se o mesmo, indicando que o método de extração é eficiente na determinação de BFA em saliva humana. Recuperações variando de 94 a 105% e coeficientes de variação percentuais variando entre 7 a 17 % foram obtidos. Os LD e LQ do método foram de 3,5 e 10,0 ng mL^{-1}, respectivamente. Várias resinas dentárias utilizadas no mercado foram submetidas ao processo de extração, sendo encontradas concentrações de BFA nas mesmas na faixa de 3,4 a 1.323,5 ng g^{-1}. Amostras de saliva de pacientes que foram submetidos a tratamento dentário com as resinas indicadas, P60 e Opalis, foram analisadas, identificando-se a lixiviação de 72,3 e 5,5 ng mL^{-1} do BFA, respectivamente, imediatamente após o tratamento.

Palavras-chave: Bisfenol A. Saliva. CG-EM.

ABSTRACT

Bisphenol A (BPA) is a monomer, formed by two phenolic rings, used in the production of polycarbonate plastics and epoxy resins. Studies have revealed that BPA acts in living organisms with effects of endocrine disruption, as a xenobiotic with estrogenic action, causing increased incidence of breast cancer, lowered sperm count, decreased fertility, birth defects secondary to fetal exposure and other changes. Additionally, it was also proven that escape from BPA resins used in dental treatment for saliva. Using a technique for detecting and quantifying gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), method was developed for analysis and validated in this work is the same, indicating that the extraction method is effective in determining BFA in human saliva. Recoveries ranged from 94 to 105% and coefficients of variation percentage ranging from 7 to 17% were obtained. The method LQ and LD were 3.5 and 10.0 ng mL^{-1}, respectively. Several dental resins used in the market were subjected to the extraction process, being found in the same BFA concentrations in the range from 3.4 to 1323.5 ng g^{-1}. Saliva samples from patients who underwent dental treatment with resins indicated by a dentist, Opalis and P60, were analyzed, identifying the leaching of 72.3 and 5.5 ng mL^{-1} of BFA, respectively, then after treatment.

Keywords: Bisphenol A. Saliva. GC-EM.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula geral do polímero de policarbonato 2

Figura 2 - Fórmula estrutural do BFA 2

Figura 3 - O sistema endócrino 3

Figura 4 - Estrutura química de estrogênios naturais (17 -estradiol, estrona e estriol) e sintéticos (17 α-etinilestradiol) 7

Figura 5 - Disfunções endócrinas: a) resposta natural, b) efeito agonista e c) efeito antagonista.....8

Figura 6 - Diferenças das estruturas do BFA e dos hormônios estrógenos.....12

Figura 8 - Resinas derivadas do BFA, BIS-DMA e BIS-GMA 17

Figura 9 - Extração líquido-líquido (ELL) 25

Figura 10 - Processo de extração em fase sólida (EFS) 26

Figura 11 - Micro extração em fase sólida (MEFS) 27

Figura 12 - Diagrama esquemático de um cromatógrafo a gás.....30

Figura 13 - Reação de derivação do BFA com BSTFA 49

Figura 14 - Fluxograma do processo de extração 50

Figura 15 - cromatograma obtido no modo scan pela injeção de 1,0 μL de solução (5,0 mg L^{-1}) padrão de BFA derivado com BSTFA.....55

Figura 16 - Espectro de massas obtido do BFA na concentração de 5,0 mg L^{-1} e derivado com BSTFA 56

Figura 17 - Cromatograma do BFA, utilizando acetonitrila como solvente extrator ..57

Figura 18 - Cromatograma do BFA, utilizando metanol como solvente extrator.....57

Figura 20 - Cromatograma do BFA, utilizando hexano como solvente extrator.....57

Figura 22 - Cromatograma obtido no modo *sim* pela injeção de 1,0 μL de solução (50 ng ml^{-1}) padrão de BFA derivado com BSTFA 59

Figura 23 - Curva analítica para o BFA com derivação 60

Figura 24 - Cromatograma obtido da análise da amostra testemunha 62

Figura 25 - Cromatograma obtido da análise do branco.....62

Figura 26 - Cromatograma obtido da análise da amostra testemunha, fortificada com 50 ng mL^{-1} de BFA 62

Figura 27 - Cromatograma obtido da análise da amostra de saliva, fortificada com 10 ng mL^{-1} de BFA 63

Figura 28 - cromatograma obtido da análise da amostra de saliva, fortificada com 30 ng mL^{-1} de BFA 63

Figura 29 - Cromatograma obtido da análise da amostra de saliva, fortificada com 50 ng mL^{-1} de BFA 63

Figura 30 - Linearidade da relação concentração de fortificação com a concentração recuperada 65

Figura 31 - Cromatograma obtido para a amostra da resina P60 após o tratamento odontológico 67

Figura 32 - Cromatograma obtido para a amostra da resina Opalis após o tratamento odontológico 68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Glândulas endócrinas, hormônios e suas funções.....4

Tabela 2 - Produção mundial de BFA.....14

Tabela 3 - Uso de BFA na europa 15

Tabela 4 - Propriedades físicas e químicas do BFA 19

Tabela 5 - Métodos recentes, encontrados na literatura, de determinação de BFA em diversas matrizes 43

Tabela 6 - Tempo de retenção e íons monitorados para o BFA com derivação 55

Tabela 7 - Recuperação obtida em diversos solventes utilizados na extração do BFA 56

Tabela 8 – LD e LQ para o BFA com derivação 58

Tabela 9 - Curva analítica obtida pela análise do BFA derivado.....59

Tabela 10 - Àreas obtidas na integração dos cromatogramas de padrões de BFA..60

Tabela 11 - Recuperações em amostras de saliva fortificadas com BFA 64

Tabela 12 - Dados obtidos das curvas de linearidade da relação concentração de fortificação com a concentração recuperada.....65

Tabela 13 - Dados obtidos das resinas que foram submetidas ao processo de extração.....66

Tabela 14 - Resultado obtido das amostras de pacientes antes e após o tratamento dentário 67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BFA	Bisfenol A
Bis-DMA	Bisfenol A – Dimetacrilato
Bis-GMA	Bisfenol A - Glicidil Metacrilato
BSTFA	N O-Bis-(trimetilsilil) trifluroacetamida
C	Coluna
CG	Cromatografia a Gás
CG-EM	Cromatografia a Gás acoplada à Espectrometria de Massa
CLAE	Cromatografia em fase Líquida de Alta Eficiência
CV	Coeficiente de Variação
DCE	Detector de Captura de Elétrons
DCM	Diclorometano
DDT	*o,p'*-1,1,1-tricloro-2,2-bis-(*p*-clorofeniletano
DE	Desreguladores Endócrinos
DIC	Detector de Ionização de Chama
DQI	Departamento de Química
EFS	Extração em Fase Sólida
ELISA	Ensaios de imunoadsorção enzimática
ELL	Extração Líquido-Líquido
EM	Espectrometria de Massas
LD	Limite de Detecção
LP-3	Laboratório de Pesquisas – 3 do Instituto de Química
LQ	Limite de Quantificação
MEFS	Micro Extração em Fase Sólida
ND	Não detectado

ND*	Não Determinado
OMS	Organização Mundial da Saúde
PVC	Cloreto de Polivinila
RE	Resinas epóxi
RIE	Radioimunoensaio
RSD	Desvio padrão relativo
SCAN	Varredura total de íons
SIM	Monitoramento de íons selecionados
TEG-DMA	Trietilenoglicol Dimetacrilato
UE	União Europeia
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
UV	Ultravioleta
UV-VIS	Ultravioleta-Visível

LISTA DE SÍMBOLOS

μg	micrograma
μL	microlitro
μm	micrometro
eV	elétron volt
kg	kilograma
kPa	kilo Pascal
m	metro
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
n	número de replicatas
ng	nanograma
nm	nanometro
Pa	Pascal
pg	picograma
R	Coeficiente de correlação
s	Estimativa do desvio padrão da resposta
S	Inclinação ou coeficiente angular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 1

1.1 O sistema endócrino 3

1.2 Desreguladores endócrinos (DE) 6

1.3 Mecanismo de ação dos hormônios 7

1.4 Substâncias classificadas como DE 9

1.4.1 Ação dos BFA como DE 10

1.4.1.1 Diferenças estruturais do BFA e dos estrógenos 12

1.5 Bisfenol A 12

1.5.1 Histórico 12

1.5.2 Produção do Bisfenol A 13

1.5.3 Uso do Bisfenol A 14

1.5.4 Toxicidade do BFA 15

1.5.5 Resinas Dentárias 16

1.5.5.1 Composição das resinas 17

1.5.5.2 Reação de polimerização de resinas odontológicas 18

1.5.6 Propriedades físicas e químicas 19

1.5.7 Efeitos no meio ambiente 20

1.5.7.1 Ambientes aquáticos 20

1.5.7.2 Ar 21

1.5.7.3 Solo 22

1.5.7.4 Efeitos à saúde humana 22

1.6 Métodos de extração 23

1.6.1 Extração com solvente 24

1.6.1.1 Extração Sólido-Líquido (ESL) 24

1.6.1.2 Extração Líquido-Líquido (ELL) 24

1.6.1.3 Extração por Fluído Supercrítico (EFSC) 25
1.6.1.4 Extração em Fase Sólida (EFS) 26
1.6.1.5 Micro Extração em Fase Sólida (MEFS) 27
1.6.1.6 Adsorção 28
1.7 Derivação 28
1.7.1 Derivantes 28
1.8 Técnicas de análise 29
1.8.1 Cromatografia em fase Gasosa (CG) 29
1.8.1.1 Colunas 30
1.8.1.2 Detector 31
1.8.2 Espectrometria de Massas (EM) 31
1.8.3 Cromatografia a Gas acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM) 32
1.9 Validação 33
1.9.1 Especificidade e seletividade 34
1.9.2 Linearidade 34
1.9.3 Faixa Linear de Trabalho 35
1.9.4 Sensibilidade 35
1.9.5 Limite de Detecção (LD) 36
1.9.6 Limite de Quantificação (LQ) 37
1.9.7 Exatidão 38
1.9.8 Precisão 38
1.9.9 Robustez 39
1.10 Legislação no Brasil 40
1.11 Métodos de análise 41
2 OBJETIVOS 46
2.1 Objetivo geral 46

2.2 Objetivos específicos....46
3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL....47
3.1 Limpeza da vidraria....47
3.2 Coleta das amostras....47
3.3 Amostra testemunha....47
3.4 Padrões, reagentes e soluções....48
3.5 Derivação do BFA....48
3.6 Extração do analito....49
3.6.1 Otimização do processo de extração....50
3.6.2 Análises....50
3.7 Estudos preliminares....51
3.7.1 Avaliação do sistema cromatográfico....51
3.7.2 Otimização do processo de derivação....51
3.7.3 Condições cromatográficas....51
3.7.4 Construção das curvas analíticas....52
3.8 Parâmetros de validação....52
3.8.1 Seletividade....52
3.8.2 Limites de detecção e quantificação....52
3.8.3 Linearidade e faixa linear de trabalho....53
3.8.4 Sensibilidade....53
3.8.5 Ensaios de recuperação....53
3.9 Análise das resinas....54
3.9.1 Amostras de saliva....54
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES....55
4.1 Estudos preliminares....55
4.1.1 Determinação dos parâmetros cromatográficos....55

4.1.2 Extração e purificação 56
4.1.3 LD e LQ do equipamento 58
4.1.4 Linearidade 59
4.2 Determinação de BFA em saliva humana 61
4.2.1 Considerações sobre o método de extração 61
4.3 Validação do método de análise de BFA em saliva 61
4.3.1 Seletividade 61
4.3.2 Ensaios de recuperação 63
4.3.3 Precisão e exatidão 64
4.3.4 Avaliação da faixa de fortificação escolhida 65
4.4 Análise das resinas 66
4.4.1 Estudo preliminar das resinas 66
4.4.2 Análise das amostras de saliva 67
5 CONCLUSÃO 69
REFERÊNCIAS 70

1 INTRODUÇÃO

Na Toxicologia Endocrinológica, uma nova área de conhecimento que está situada entre a endocrinologia e a toxicologia, o principal objeto de estudo é as substâncias denominadas xenobióticas (substâncias químicas de origem exógena: plantas, produtos sintéticos, poluentes ambientais, etc.), que interferem na produção, liberação, transporte, metabolismo, ligação ou eliminação dos hormônios naturais, os responsáveis pela manutenção da homeostasia e regulação dos processos de desenvolvimento. Entre os xenobióticos incluem-se substâncias químicas que mimetizam os estrogênios, anti-androgênios e moléculas atuantes em componentes do sistema endócrino tais como tireóide, hipotálamo e hipófise, entre outros (CRISP et al., 1998; BRUCKER-DAVIS, 1998; HARRISON; HOLMES; HUMFREY, 1997; SONNENSCHEIN; SOTO, 1998).

Até agora, a maioria dos estudos concentrou-se na ação estrogênica de várias substâncias químicas de origem sintética, denominadas *xenoestrogênios*: xenobióticos com estrutura não esteróide e com ação similar aos estrogênios endógenos (SONNENSCHEIN; SOTO, 1998).

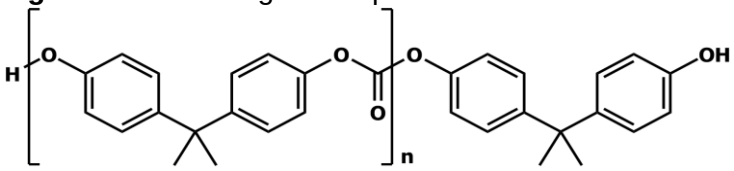
A ideia de que a exposição de homens e animais às substâncias do meio ambiente com ação estrogênica poderia resultar em alterações adversas ao desenvolvimento reprodutivo, funcional e/ou comportamental não é nova. A primeira preocupação com este assunto surgiu há (*sic*) trinta anos em relação ao *o,p'*-1,1,1-tricloro-2,2-bis-(*p*-clorofeniletano (DDT). Ainda em 1938, foi feita a primeira demonstração de que alguns produtos químicos poderiam ter ação estrogênica quando administrados em animais (GOLOUBKOVA; SPRITZER, 2000).

Várias hipóteses investigaram a possibilidade da exposição a agentes químicos ambientais com ação estrogênica, estar relacionada ao aumento da incidência de câncer de mama (ASCHENGRAU et al., 1998), queda da quantidade de esperma, diminuição da fertilidade (JENSEN et al., 1995; TOPPARI et al., 1996) defeitos congênitos secundários à exposição fetal (SAUNDERS et al., 1997) e outras alterações (ROY; COLERANGLE; SINGH, 1998).

Um dos compostos que tem ultimamente gerado grandes discussões é o Bisfenol A (BFA). A atividade estrogênica do BFA foi descoberta ocasionalmente. Pesquisadores da Universidade de Stanford identificaram uma proteína ligadora de estrogênio em levedura e, posteriormente, estudaram a existência de um ligante

endógeno acoplado a esta proteína. Depois do primeiro relato de que a levedura produzia estradiol (FELDMAN et al., 1984), esses autores verificaram que a atividade estrogênica não era proveniente da levedura, mas sim do meio de cultura preparado com água autoclavada em frasco de policarbonato (KRISHNAN et al., 1993). A estrutura do policarbonato pode vista na Figura 1.

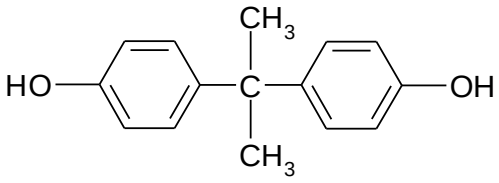
Figura 1 - Fórmula geral do polímero de Policarbonato



Fonte: SBQ, 2008.

A substância foi purificada e identificada como BFA [2,2-bis(4-hidroxifenil)propano]. Aproximadamente $2x10^3$ - 3 $x10^3$ ng mL^{-1} foram detectados em água autoclavada. Foi demonstrado que o BFA satisfaz todos os critérios para substância estrogênica, com dose mínima efetiva de 2,28 – 4,56 ng mL^{-1} (GOLOUBKOVA; SPRITZER, 2000). A estrutura do BFA é apresentada na Figura 2.

Figura 2 - Fórmula estrutural do BFA



Fonte: SBQ, 2008.

As análises dos desreguladores endócrinos nas águas e solos são de suma importância para as organizações ambientais, devido as suas ocorrências frequentes nos dejetos industriais, lançamentos de esgotos domésticos e águas naturais e por deixarem suas características deletérias mesmo em dosagens ínfimas, lembrando que o estrógeno natural age em concentrações baixíssimas, medidas em partes por trilhão e os estrógenos fracos estão presentes no sangue e na gordura corporal em concentrações de partes por bilhão ou por milhão; assim, mesmo que os níveis de contaminação pareçam ser minúsculos, não são

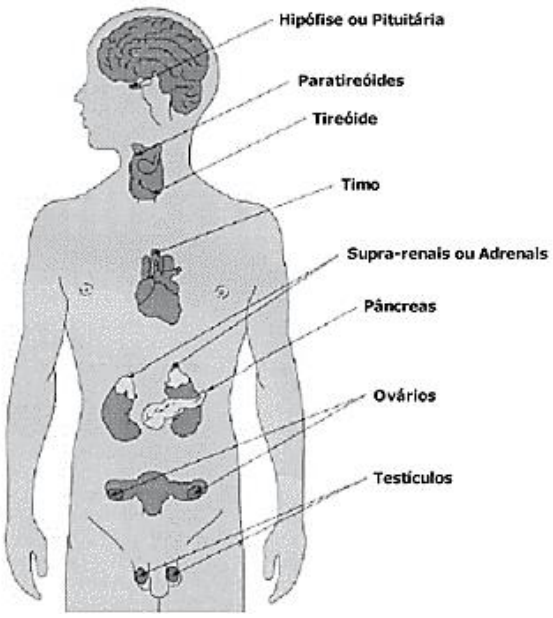
necessariamente inconsequentes (ZAFRA et al., 2003; TSUTSUMI, 2005; COLBORN; DUMANOSKI; MYERS, 2002).

1.1 O sistema endócrino

Sistema endócrino (Figura 3) é um sistema de comunicação em que as glândulas ou células especializadas liberam, no sangue circulante, substâncias químicas (hormônios) que influenciam a função das células em outros locais do corpo (GUYTON; HALL, 2002).

Os sistemas circulatórios transportam os hormônios endócrinos para as células distribuídas por todo o corpo, incluindo em certos casos, o sistema nervoso, onde se ligam a receptores e iniciam várias reações. Alguns hormônios endócrinos afetam a maioria das células do corpo, como por exemplo, o hormônio do crescimento (hipófise anterior) causa crescimento em quase todas as partes do corpo, enquanto a tiroxina (da tireóide) aumenta a velocidade de muitas reações químicas também em quase todas as células do organismo (GUYTON; HALL, 2002). A Tabela 1, a seguir, relaciona algumas glândulas endócrinas com os hormônios e suas funções.

Figura 3 - O Sistema Endócrino



Fonte: GHISELLI; JARDIM, 2007.

Tabela 1 - Glândulas endócrinas, hormônios e suas funções

Glândula	Hormônios	Principais funções
Hipotálamo	Hormônio de liberação da tireotropina (TRH)	Estimula a secreção de TSH e prolactina
	Hormônio de liberação da corticotropina (CRH)	Produz a liberação de ACTH
	Hormônio de liberação do hormônio de crescimento (GHRH)	Causa a liberação do hormônio de crescimento
	Hormônio de liberação das gonadotropinas (GnRH)	Induz a liberação de LH e de FSH
	Dopamina, ou fator inibitório da prolactina (PIF)	Inibe a liberação de prolactina
Hipófise anterior	Hormônio de crescimento (GH)	Estimula a síntese de proteínas e o crescimento global da maioria dos tecidos
	Hormônio tireoestimulante (TSH)	Estimula a síntese e a secreção dos hormônios tireóides (tiroxina e triiodotironina)
	Hormônio adrenocorticotrópico (ACTH)	Estimula a síntese e a secreção dos hormônios adrenocorticais (cortisol, androgênio e aldoesterona)
	Prolactina	Promove o desenvolvimento das mamas femininas e a secreção de leite
	Hormônio foliculoestimulante (FSH)	Causa o crescimento dos folículos, nos ovários, e a maturação dos espermatozóides, nas células de Sertoli, dos testículos
	Hormônio luteinizante (LH)	Estimula a síntese de testosterona das células de Leydig dos testículos; estimula a ovulação, a formação do corpo lúteo e a síntese de estrogênio e progesterona nos ovários
Hipófase posterior	Hormônio antidiurético (ADH) (também denominado vasopressina)	Aumenta a reabsorção de água pelos rins e causa vasoconstrição e elevação da pressão arterial

Tabela 1 - Glândulas endócrinas, hormônios e suas funções (continuação)

Glândula	Hormônios	Principais funções
Tireóide	Tiroxina (T_4) e Tri-iodotironina (T_3)	Aumenta a velocidade das reações químicas na maioria das células, aumentando assim o metabolismo corporal.
	Calcitonina	Promove a deposição de cálcio nos ossos e a concentração de íons cálcios no líquido extracelular
Córtex adrenal	Cortisol	Múltiplas funções metabólicas no controle do metabolismo das proteínas, carboidratos e gorduras; tem também efeitos anti-inflamatórios
	Aldosterona	Aumenta a reabsorção renal de sódio e a secreção de íons hidrogênio
Pâncreas	Insulina (células β)	Promove a entrada de glicose em muitas células e, dessa maneira, controla o metabolismo dos carboidratos
	Glucagon (células α)	Aumenta a síntese e a liberação de glicose, pelo fígado
Paratireóide	Hormônio paratireóideo (PTH)	Controla concentração sérica de íons cálcio aumentando a absorção de cálcio pelo intestino e pelos rins e liberando cálcio dos ossos
Testículos	Testosterona	Promove o desenvolvimento do sistema reprodutor masculino e os caracteres sexuais secundários masculinos
Ovários	Estrógenos	Promove o crescimento e o desenvolvimento do sistema reprodutor feminino, das mamas femininas e dos caracteres sexuais secundários femininos
	Progesterona	Estimula a secreção do “leite uterino” pelas glândulas endometriais do útero e promove o desenvolvimento do aparelho secretor das mamas

Fonte: GUYTON; HALL, 2002.

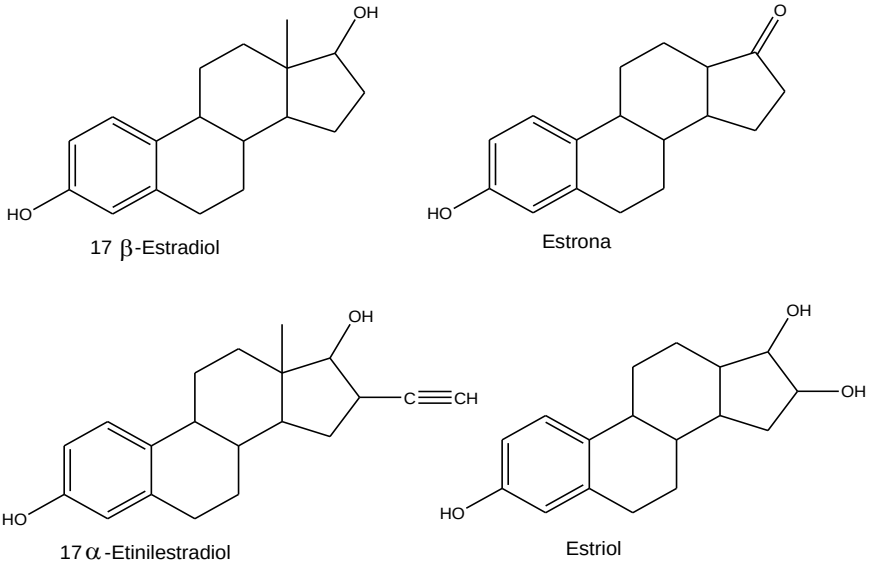
1.2 Desreguladores endócrinos (DE)

Os desreguladores endócrinos (DE) encaixam-se em uma categoria de substâncias que interferem nas funções do sistema endócrino. Essas substâncias são encontradas no meio ambiente em concentrações da ordem de ng mL^{-1} e ng L^{-1} e causam efeitos adversos à saúde humana e animal. Os DE abrangem uma grande faixa de classes de substâncias com estruturas distintas, incluindo hormônios sintéticos e naturais, substâncias naturais e uma grande quantidade de substâncias sintéticas (BILA; DEZOTTI, 2007).

Na literatura existem várias definições para um DE. No entanto, em todas elas existe um ponto em comum: trata-se de uma substância química que pode interferir no funcionamento natural do sistema endócrino de espécies animais, incluindo os seres humanos. Tal substância pode ser de origem antrópica, também denominada xenoestrogênio, ou de origem natural como, por exemplo, os fitoestrogênios (GHISELLI; JARDIM, 2007).

As substâncias estrogênicas presentes no meio ambiente são frequentemente referidas como: estrogênios ambientais, estrogênios exógenos ou exoestrogênios. Exoestrogênios são diversos grupos de substâncias que não necessariamente apresentam alguma semelhança com a estrutura química do 17β-estradiol, mas causam respostas antagônicas e agônicas, possivelmente através de mecanismos de ação via receptores hormonais. Os estrogênios endógenos são produzidos naturalmente pelo corpo humano, como por ex., o 17β-estradiol e a estrona. A Figura 4 apresenta as estruturas químicas de alguns estrogênios naturais e sintéticos. As substâncias sintéticas com atividade estrogênica também são denominadas xenoestrogênios (SOTO et al., 1995). Os termos estrogênios ambientais ou eco-estrogênios também geram controvérsias no meio científico, pois omitem a possibilidade de substâncias que não sejam estrogênicas, como por ex., andrógenos (hormônios masculinos), antiandrógenos e antiestrogênicas, poderem afetar o sistema endócrino. Outros autores usam o termo substância estrogênica para quaisquer substâncias que interagem com receptores de hormônios esteroides, sendo ele receptor de estrogênio ou não (BILA; DEZOTTI, 2007).

Figura 4 - Estrutura química de estrogênios naturais (17 - Estradiol, Estrona e Estriol) e sintéticos (17 α-Etinilestradiol)



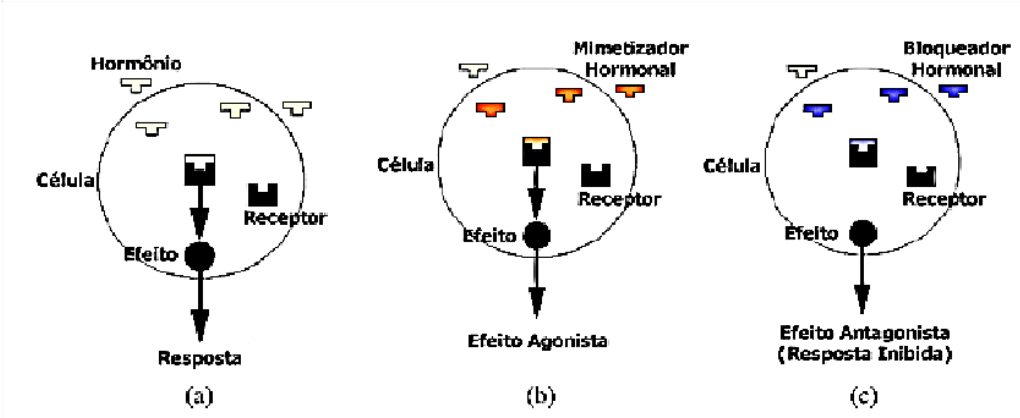
Fonte: BILA; DEZOTTI, 2007.

1.3 Mecanismo de ação dos hormônios

A primeira etapa na ação de um hormônio é sua ligação a receptores específicos na célula-alvo. Se as células não possuem receptores para os hormônios, os mesmos não respondem. Esses receptores podem encontrar-se na membrana da célula-alvo, no citoplasma, ou no núcleo da célula. A combinação do hormônio com seu receptor costuma desencadear uma cascata de reações na célula, em que cada etapa torna-se ativada mais poderosamente, de tal forma que baixas concentrações do hormônio podem gerar grandes efeitos (GUYTON; HALL, 2002).

Um receptor hormonal possui elevada sensibilidade e afinidade por um hormônio específico, produzido no organismo. Devido a isso, concentrações extremamente baixas de um determinado hormônio geram um grande efeito, produzindo uma resposta natural (Figura 5a). Adicionalmente, estes receptores hormonais também se ligam com outros compostos químicos. Isso explica o porquê de determinados DE presentes no organismo, mesmo em baixíssimas concentrações, serem capazes de gerar um grande efeito, provocando consequentemente uma resposta (GHISELLI; JARDIM, 2007).

Figura 5 - Disfunções endócrinas: a) resposta natural, b) efeito agonista e c) efeito antagonista



Fonte: GHISELLI; JARDIM, 2007.

A alteração no sistema endócrino ocorre quando o DE interage com os receptores hormonais, modificando a sua resposta natural. Dois processos distintos podem ser desencadeados: efeito agonista (Figura 5b) e efeito antagonista (Figura 5c). No processo denominado efeito agonista, a substância química se liga ao receptor hormonal e produz uma resposta, atuando então como um mimetizador, ou seja, imitando a ação de um determinado hormônio. No efeito antagonista, a substância se liga ao receptor, mas nenhuma resposta é produzida, sendo que dessa forma ela estará agindo como um bloqueador, ou seja, estará impedindo a interação entre um hormônio natural e seu respectivo receptor (LINTELMANN et al., 2003).

Os receptores são proteínas grandes. Para que cada célula seja estimulada, ela conta com cerca de 2.000 a 100.000 receptores muito específicos para determinado hormônio. Hormônios, como os estrogênios, iniciam o crescimento das mamas e do aparelho produtor de leite e respondem pelo crescimento característico e também pelo aspecto externo das mamas femininas maduras. Nos esqueletos, os estrogênios produzem um aumento da atividade osteoblástica do osso, fazendo com que na puberdade, na entrada da mulher nos anos reprodutivos, o crescimento acelere-se durante vários anos e também com efeito potente sobre o crescimento do esqueleto. Os estrogênios atuam também sobre o revestimento mucoso das tubas de Falópio e causam proliferação dos tecidos desse revestimento, afetando ainda a

deposição de proteínas, o metabolismo, a deposição de gordura, a distribuição de pelos, a pele e o balanço eletrolítico (GUYTON; HALL, 2002).

1.4 Substâncias classificadas como DE

Com base em informações disponíveis na literatura foram elaboradas, por várias organizações mundiais, listas de substâncias químicas suspeitas de causar desregulação do sistema endócrino. Contudo, ainda são necessários mais dados científicos para uma investigação mais profunda, a fim de identificar os critérios de seleção utilizados para agrupar as substâncias nestas listas.

A União Europeia (UE) fez o primeiro passo para estabelecimento de uma lista de substâncias para a futura avaliação do seu papel na desregulação endócrina (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 1999; COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 2001; PETROVIC et al., 2001).

Em 2000, foi proposta uma lista com 553 substâncias sintéticas e 9 hormônios naturais (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 2001). Dessas substâncias, existem evidências de desregulação endócrina ou potencial de desregulação endócrina para 118 substâncias. Para as outras 435 substâncias, dados insuficientes foram apresentados nesse relatório. O segundo estudo abrangeu estas substâncias para as quais os dados foram insuficientes no relatório de 2000, sendo dividida em três grupos de substâncias, dependendo do volume de produção, da persistência no meio ambiente, das provas de desregulação endócrina encontradas em bibliografias científicas e nas considerações relativas à exposição. Fora da lista de 435 substâncias, outras 147 substâncias foram avaliadas; desse último grupo de substâncias, 129 foram restringidas pela UE por motivos distintos da desregulação endócrina (BILA; DEZOTTI, 2007).

Segundo BILA e DEZOTTI (2007), as substâncias classificadas como DE, incluindo substâncias naturais e sintéticas, usadas ou produzidas para uma infinidade de finalidades podem ser agrupadas em duas classes:

a) substâncias não naturais - utilizadas na agricultura e seus subprodutos, como pesticidas, herbicidas, fungicidas e moluscicidas; utilizadas nas indústrias e seus subprodutos, como dioxinas, bifenilas policloradas, alquilfenóis e seus subprodutos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

(HPA), ftalatos, BFA, metais pesados, entre outros; compostos farmacêuticos, como os estrogênios sintéticos dietilestilbestrol e 17α-etinilestradiol;

b) substâncias naturais - fitoestrogênios, tais como, genisteína e metaresinol e estrogênios naturais, 17β-estradiol, estrona e estriol.

1.4.1 Ação do BFA como DE

O BFA é o mais comum desregulador endócrino de característica estrogênica e as alterações neurocomportamentais induzida por esse desregulador é mais problemática quando ocorre em estágios de desenvolvimento sensível do ciclo de vida. As alterações comportamentais são efeito da exposição crônica a baixas doses de BFA (RAZZOLI et al., 2005).

Foram observados a desmasculinização e feminilização em peixes (LUTZ; KLOAS, 1999) em répteis e mamíferos de áreas expostas a produtos químicos industrializados, como herbicidas, fungicidas, pesticidas e efluentes industriais (COLBORN; DUMANOSKI; MYERS, 2002).

Demonstrou-se em estudos *in vitro* que o BFA é um composto com fraca ação estrogênica, por volta de 1.000 a 15.000 vezes menos potente do que o estradiol, o hormônio feminino, ou o estriol (GOULD et al., 1998). O BFA mimetiza o estradiol e liga-se tanto ao receptor estrogênico *α* (MILLIGAN; BALASUBRAMANIAN, 1998) como ao *β* (KUIPER et al., 1998).

Experimentos com fêmeas adultas de ratos, expondo-as prolongadamente a baixas doses de BFA durante a gravidez e a lactação, mostraram que ocorre alteração no comportamento maternal e também sexual (PORRINI et al., 2005) sem considerar o sexo dos filhotes e o período de observação, havendo uma redução no tempo gasto na alimentação dos filhotes e redução na frequência de lambidas genitais; um aumento no tempo gasto fora do ninho; além disso, uma exposição prolongada ao BFA na fase de lactação induziu um decréscimo das células α-receptoras de estrogênio (SETA et al., 2005).

Muitos estudos associaram as adversidades causadas pelo BFA em embriões de ratos a um aumento de um tipo específico de mutação encontrada em muitos abortos espontâneos em humanos. Notou-se que os danos na divisão celular

em ratos foram provocados por níveis baixíssimos de BFA, coincidentemente com os níveis liberados de embalagens de água fabricadas com a matéria prima do policarbonato (JENSEN et al., 1995; MILLIGAN; BALASUBRAMANIAN, 1998).

Em seres humanos, foi encontrado BFA no soro e no fluido folicular em dosagem 1-2 ng mL^{-1}; em soro fetal (fluido amniótico) entre 15 e 18 semanas de gestação, confirmando a passagem através da placenta. Uma maior concentração foi revelada no fluido amniótico de 15-18 semanas de gestação, em comparação com outros fluidos que mostram um aumento da exposição ao período crítico do desenvolvimento em humanos (TSUTSUMI, 2005).

O BFA foi detectado em concentrações de 1-10 ng mL^{-1} no soro de mulheres grávidas, no líquido amniótico dos fetos e no soro tirado do cordão umbilical dos nascituros. Foi também encontrado em concentrações acima de 100 ng g^{-1} em placenta (ZOELLER, 2005; KOSARAC et al., 2012).

Impactos adversos significativos são causados pelo BFA no desenvolvimento de fetos de inúmeras espécies. Esse dano ocorre em concentrações usualmente encontradas em mulheres grávidas (ROY; COLERANGLE; SINGH, 1998; SAUNDERS et al., 1997). Estudos comprovaram também a presença de BFA em amostras de fígado fetal humano e em placentas, logo no terceiro mês de gestação (ZHANG et al., 2010).

O BFA tem apresentado vários efeitos deletérios e ainda há muito a se esclarecer sobre a exposição precoce do BFA aos seres humanos, como o decrescimento na produção de esperma nos homens, como a estimulação de liberação de prolactina e a promoção de proliferação de células em câncer de mama nas mulheres; o aumento da má formação nos aparelhos reprodutivos feminino e masculino; como o fenômeno de maturação precoce em garotas e outras perturbações genéticas (TSUTSUMI, 2005; KROTZ et al., 2012).

Considerando o padrão elevado de exposição humana ao BFA, que acarreta uma absorção diária por pessoa da ordem de 6,6 µg, mostrou-se que a glândula tireoide também sofre com o BFA e que esse composto inibe significativamente a ação dos hormônios tiroidianos (ZOELLER, 2005; GHISARI; BONEFELD-JORGENSEN, 2005; KOSARAC et al., 2012).

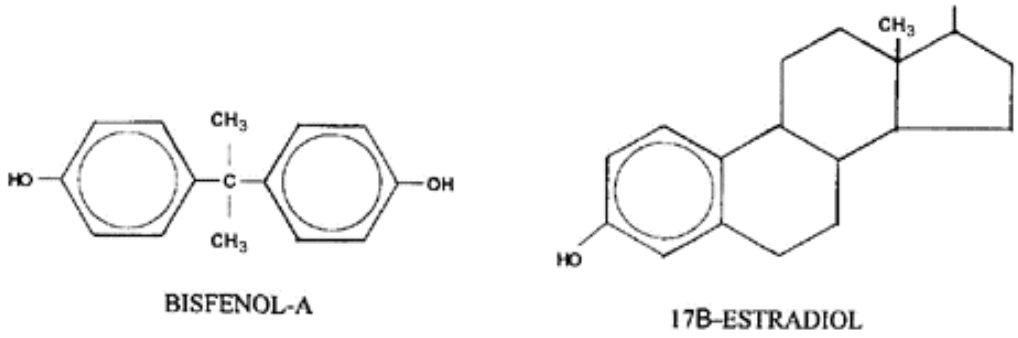
Ashby e Tinwell (1998) comprovaram que o BFA gera mutações permanentes nas regiões do encéfalo associadas ao mal de Parkinson. Notaram que em ratos há um crescimento da dependência de drogas como as anfetaminas e que

em mulheres pode predispor seus filhos a tendências para estimulantes psicotrópicos.

1.4.1.1 Diferenças estruturais do BFA e dos estrógenos

Apesar do fato de o BFA ser confundido pelo organismo com o hormônio feminino estrógeno, vindo a ocupar seus receptores, sua estrutura é completamente diferente desses hormônios, conforme se vê na Figura 6 a seguir.

Figura 6 - Diferenças das estruturas do BFA e dos hormônios estrógenos



Fonte: GOLOUBKOVA; SPRITZER, 2000.

1.5 Bisfenol A

1.5.1 Histórico

O BFA foi sintetizado no final do século XIX pelo russo Aleksandr Dianin e ficou conhecido como composto de Dianin.

O BFA foi investigado nos anos de 1930 durante a busca de estrogênios sintéticos. Naquele tempo, outro composto sintético, dietilestilbestrol, foi determinado como sendo mais poderoso do que o próprio estrogênio, assim o BFA não foi usado como um estrogênio sintético (TOXIPEDIA, 2013).

1.5.2 Produção do Bisfenol A

O BFA é produzido por dois métodos diferentes. O primeiro é pela condensação do fenol com acetona em condições de pH ácido, alta temperatura e em presença de catalisadores; na sequência o BFA é purificado através de destilação, filtrado e seco. O segundo método de produção é similar ao primeiro, porém usa diferentes tecnologias de catálise e purificação, permitindo maior economia de reagentes. Alguns resíduos são gerados no processo de produção (água de lavagem e efluentes), os quais podem ser liberados indevidamente dos sistemas fechados durante o processamento na forma de pó. Em 1993, foi estimado que 109 toneladas, ou 0,017% de 640.000 toneladas métricas de BFA produzido no mundo, foram liberadas para o ar, águas superficiais ou plantas de tratamento de efluentes (STAPLES; et al., 1998).

A demanda por BFA está prevista para crescer de 3,9 milhões de toneladas em 2006 para cerca de 5 milhões de toneladas em 2010. O mercado dos EUA deverá crescer a 4,2% ao ano até 2010, com policarbonatos e resinas epóxi crescendo a 4,5% ano e 3,5% ano, respectivamente. Entre 2000 e 2006, os mercados asiáticos de BFA cresceram a uma média de 13% ao ano, com 19% para o policarbonato. Até 2005, o crescimento deveu-se principalmente à demanda por resina epóxi. No entanto, a demanda BFA na China será impulsionada no futuro por policarbonatos com uma estimativa de demanda por BFA (principalmente policarbonato e resinas epóxi) de cerca de $2,25 \times 10^6$ toneladas em 2010 (HUANG; et al., 2012). Os dados referente a produção mundial de BFA podem ser visto na Tabela 2.

Tabela 2 - Produção mundial de BFA

País/Região	Produção (ton ano^{-1})	Porcentagem
EUA	1075	22,9
Brasil	27	0,6
Bélgica	220	4,7
Alemanha	456	9,7
Holanda	410	8,7
Espanha	280	6,0
Rússia	165	3,5
Polônia	12	0,3
China	167	3,6
Taiwan	615	13,1
Japão	611	13,0
Coréia	260	5,5
Singapura	230	4,9
Tailândia	160	3,4
Tchecoslováquia	8,5	0,2
Total	**4696.5**	**100**

Fonte: HUANG; et al., 2012.

1.5.3 Uso do Bisfenol A

O BFA é usado para sintetizar policarbonato e resina epóxi. O policarbonato é utilizado em vários produtos dos meios digitais (por exemplo, CDs, DVDs), equipamentos elétricos e eletrônicos, equipamentos de segurança dos esportes, recipientes reusáveis de alimentos e bebidas, e em muitos outros produtos. As resinas epóxi têm muitos usos, incluindo lâminas para placas de circuitos elétricos, complexos dentários, pinturas, adesivos, revestimentos protetores de latas de alimentos e bebidas (BISPHENOL A, 2002). Um estudo recente realizado no Estados Unidos identificou a presença de BFA em amostras de vegetais e frutas obtidas nos mercados locais na concentração de 8,5 µg Kg^{-1} (LU, 2012).

Na Tabela 3 são apresentados os principais usos do monômero de BFA na Europa.

Tabela 3 - Uso de BFA na Europa

Uso	**ton ano^{-1}**	**% de consumo**
Produção de policarbonato	486.880	71,1
Produção de resina epóxi	171.095	25,0
Resinas feno plásticas	8.800	1,3
Produção de resinas de poliéster	3.000	0,4
Fabricação de revestimentos	2.460	0,4
Produção de PVC	2.250	0,3
Produção de BFA alquiloxilado	2,020	0,3
Produção de papel térmico	1.400	0,2
Produção de poliuretano	950	0,1
Produção de poliamida modificada	150	<0,1
Fabricação de pneus	110	<0,1
Fluído de freio	45	<0,1
Outros usos	5.990	0,9
Consumo total	**684.650**	

Fonte: GROSHART; OKKERMAN; PIJNENBURG, 2001.

1.5.4 Toxicidade do BFA

O BFA tem sido há muito tempo documentado por seus riscos e potenciais efeitos nocivos. Os primeiros estudos realizados sobre este monômero foram na década de 1930. Naquele momento, um crescente interesse no uso do BFA, levantou preocupações de como esta substância reage em organismos vivos. Os estudos indicaram que o BFA era uma fraca molécula estrogênica, mas o dado foi amplamente rejeitado. Nesta época, grande parte das atenções estava sendo direcionada para a proeza notável de recriação de estrogênio humano sintético. Além disso, o extremamente potente dietilestilbestrol (DES) sintético, um fármaco estrogênico oral, foi desenvolvido. Estudos sobre BFA o compararam de modo não científico ao dietilestilbestrol, um composto muito fortemente estrogênico. E, assim, o BFA foi ignorado. Todavia, estudos realizados em 1936 por Dodds e Lawson confirmaram o efeito estrogênico do BFA. Os seus experimentos arcaicos foram

conduzidos em ovários retirados de ratas. Depois, cada rata foi alimentada diretamente com BFA. Os resultados publicados a partir deste momento de investigação primitiva revelam excesso de ativação dos receptores de estrogênio mediante atividade agonista. Agonistas, como o BFA, são produtos químicos que imitam o substrato molecular original, suscitando uma reação química semelhante ou idêntica ao original. Os dois pesquisadores estavam particularmente interessados nos componentes moleculares que acionava o aumento da concentração do hormônio estrogênio, e não tanto nos efeitos. Pesquisas recentes têm sido exaustivas e muito mais conclusivas, talvez estimuladas pela sua popularidade e porque o uso deste tóxico tem aumentado (TOXIPEDIA, 2013).

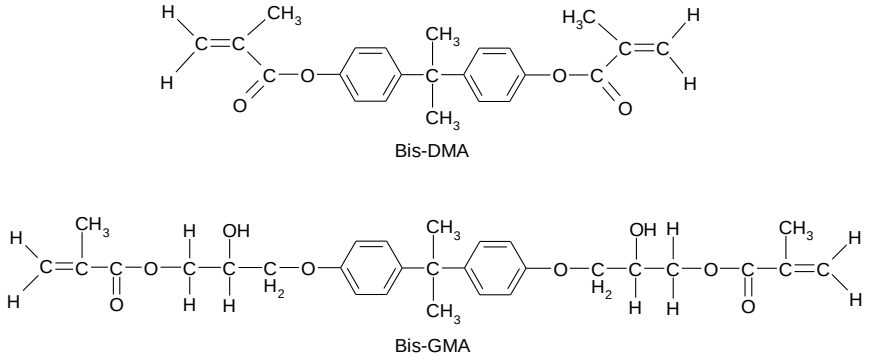
1.5.5 Resinas Dentárias

Muitas resinas utilizadas no tratamento dentário de pacientes são compostas pelo BFA. Estas resinas são aplicadas nos pacientes, sendo polimerizadas *em situ* através de foto-ativação. Porém, a tecnologia empregada não permite que haja uma completa conversão dos monômeros durante o processo de cura; dessa forma, monômeros livres de BFA, podem ser lixiviados para fora da resina curada (NATHANSON et al., 1997).

Um estudo recente, feito com 151 pacientes submetidos a procedimento odontológico, identificou que a colocação de restaurações à base de BFA foi associada com aumentos detectáveis na saliva de BFA uma hora após a colocação da restauração e um aumento da concentração de BFA na urina de nove a 30 horas após a colocação da restauração (KINGMAN et al., 2012).

O BFA é o precursor dos monômeros das resinas *Bisfenol A - Glicidil Metacrilato* (Bis-GMA) e *Bisfenol A - Dimetacrilato* (Bis-DMA), cujas estruturas estão mostradas na Figura 8. Durante o processo de obtenção destas resinas, o BFA pode estar presente como impureza devido a uma reação não estequiometricamente controlada, podendo também ser oriundo da degradação das resinas quando estas entram em contato com a saliva (SÖDERHOLM; PHIL; MARIOTTI, 1999).

Figura 7 - Resinas derivadas do BFA, Bis-DMA e Bis-GMA



Fonte: SÖDERHOLM et al., 1999.

Olea e colaboradores (1996) constataram que o BFA escapa dos dentes tratados com resinas para a saliva. Foram encontrados até 950 μg L^{-1} de BFA na saliva dos pacientes durante a primeira hora, após a polimerização.

Em um estudo de estabilidade da resina Bis-DMA, constatou-se que esta é rapidamente convertida a BFA quando na presença de saliva. Amostras de saliva contendo 200 ng mL^{-1} de Bis-DMA foram mantidas a 37ºC por 24 h e em seguida levadas para análise, sendo verificado que a concentração de Bis-DMA havia diminuído para cerca de 21,8 ng mL^{-1} e a concentração de BFA havia subido de zero para aproximadamente 100 ng mL^{-1} (ATKINSON et al., 2002).

Em outro trabalho, ratas foram submetidas a doses diárias de 25 e 100 μg kg^{-1} de ambos os compostos, Bis-GMA e TEG-DMA (trietilenoglicol dimetacrilato), por 28 dias. Observou-se que ambos os compostos apresentaram efeitos tóxicos sobre a reprodução das ratas (DARMANI; Al-HIYASAT, 2006).

Estudos realizados em pacientes que passaram por tratamento dentário identificaram a presença de BFA na saliva e na urina dos pacientes, sendo que os níveis tiveram um crescente aumento dentro das primeiras 24 horas após o tratamento dentário (JOSKOW; BARR, 2007; HSU et al., 2012).

1.5.5.1 Composição das resinas

As resinas odontológicas em geral são constituídas de duas partes, uma orgânica e outra inorgânica. Essa combinação permite que esse material alcance

melhores propriedades que dos componentes originais. A composição é um dos fatores determinantes das propriedades mecânicas da resina, sendo que o tamanho e a quantidade de carga presente no material são os aspectos de maior influência. Na parte orgânica da resina encontramos em geral os monômeros, componentes de maior importância, pois são eles que se unem para formar o polímero; os iniciadores (geralmente as canforquinonas), que são responsáveis por iniciar o processo de polimerização, os estabilizadores (hidroquinonas) e o agente de união (silano). Como parte inorgânica, temos os pigmentos (corantes minerais) que dão as diferentes tonalidades às resinas, o agente radiopacificador (geralmente dióxido de titânio) e as partículas inorgânicas, que também são chamadas de partículas de carga (geralmente composta por sílica coloidal, quartzo, vidro moído, entre outros). Essas partículas dão uma maior resistência à resina além de diminuir a contração no processo de polimerização (ROCHA, 2006).

Atualmente, os compósitos odontológicos são constituídos basicamente por um monômero multifuncional de cadeia longa. O monômero Bis-GMA, ou resina de Bowen, é o monômero mais usado na odontologia e caracteriza-se por uma molécula longa e rígida com duplas ligações de carbono reativas nas extremidades.

1.5.5.2 Reação de polimerização de resinas odontológicas

A reação de polimerização da resina caracteriza-se por uma mudança do estado líquido para o estado sólido desse material, capaz de vedar uma cavidade e suportar as forças mastigatórias (MENEGAZZO, 2007).

A reação de polimerização necessita que a luz utilizada seja capaz de excitar as moléculas fotoiniciadoras (geralmente as canforquinonas). Uma vez excitadas, essas moléculas passam para um estado excitado triplete e reagem com as substâncias ativadoras (aminas terciárias). Essa combinação possibilita o surgimento dos radicais livres capazes de atacar ligações duplas alifáticas presentes no monômero, iniciando assim o processo de polimerização. No início da reação, existe uma maior quantidade de monômeros do que de radicais livres, favorecendo a taxa de propagação das cadeias reativas. Em um determinado momento, com o meio reacional ainda pouco viscoso, as concentrações se equivalem, pois uma parte dos monômeros já foi incorporada às cadeias em propagação, gerando os

macroradicais. Logo em seguida, o termino da reação cresce pela grande probabilidade de interação dos radicais cadeias, que tendem a se ligar por combinação (ROCHA, 2006).

Apesar de não formar subprodutos, a reação não é completa, pois o número de ligações vinílicas $=CH_2$ no meio reacional não é totalmente completa durante a reação. As ligações remanescentes estão presentes nos monômeros que não reagiram (monômero residual) ou nos que reagiram parcialmente com as cadeias poliméricas (grupamento pendente). O grau de conversão do compósito é definido como a quantidade de duplas ligações entre carbonos (C=C) que foi quebrada durante o processo de polimerização da resina.

1.5.6 Propriedades físicas e químicas

Sob condições ambientais, o BFA é um sólido, vendido na forma de pastilhas, flocos ou cristais. Na Tabela 4 são mostradas as principais propriedades físicas deste composto.

A solubilidade em água do BFA determinada por vários autores varia de 120 a 300 mg L^{-1}. Da mesma forma, são citados diferentes valores para a pressão de vapor, densidade e pKa, sendo que a maior variação entre os resultados é observada na determinação da pressão de vapor, propriedade esta que classifica o BFA como um composto de baixa volatilidade (STAPLES et al., 1998).

Tabela 4 - Propriedades físicas e químicas do BFA

Propriedade	**Valor**
Massa molar	228 $g.mol^{-1}$
Fórmula molecular	$C_{15}H_{16}O_2$
Densidade*	1.195 $g.cm^{-3}$
Ponto de ebulição	398ºC (760 mm.Hg)
Ponto de fusão	155ºC
pKa	9,59 - 11,30
Solubilidade em água	300 $mg.L^{-1}$
Pressão de vapor	5,3 x 10^{-6} KPa

Fonte: STAPLES, 1998.

1.5.7 Efeitos no meio ambiente

Vários sistemas bióticos e abióticos são responsáveis pela degradação e dispersão do BFA no meio ambiente. Além do BFA ser solúvel em água, ele está sujeito à adsorção por sedimentos e à biodegradação, podendo possivelmente sofrer fotodegradação. O BFA não tende a ser volatilizado ou hidrolisado em águas naturais (STAPLES et al., 1998).

1.5.7.1 Ambientes aquáticos

O BFA pode ser encontrado em estações de tratamento de efluentes de fábricas que o utilizam, isto porque ele não é completamente removido durante a etapa de tratamento. Portanto, esta água proveniente de estações de tratamento pode ser uma fonte de contaminação do ambiente aquático uma vez que a redução do BFA durante a etapa de tratamento varia de 37 a 94% (KANG; KONDO; KATAYAMA, 2006; GARCÍA; GÓMEZ; VÍLCHEZ, 2012; MORALES; FERRERA; RODRÍGUEZ, 2012).

De acordo com estudos conduzidos nos Estados Unidos (STAPLES et al., 1999), Alemanha (BOLZ; HAGENMAIER; KÖRNER, 2001; FROMME et al., 2002; HEEMKEN et al., 2001), Japão (MATSUMOTO, 1982) e Holanda (BELFROID et al., 2002; HENDRIKS; MAAS-DIEPEVEEN; NOORDSIJ, 1994), os níveis de BFA encontrados em rios são inferiores a 8 $ng.mL^{-1}$, com exceção de um (21 $ng\ mL^{-1}$) (BELFROID et al., 2002).

Em água de rio, o BFA pode ser degradado sob condições aeróbicas (IKE; JIN; FUJITA, 2000; KANG; KONDO, 2002a; KLEËCKA et al., 2001), porém não sob condições anaeróbicas (KANG; KONDO, 2002b). Em 2002, Kang e Kondo (2002a) encontraram que 10 entre 11 bactérias isoladas da água de três rios biodegradavam o BFA, porém havia diferenças nas taxas de remoção do BFA (18-91%) e somente duas linhagens (*Pseudomonas* sp. e *Pseudomonas putida*) mostraram alta biodegradabilidade do BFA (aproximadamente 90%).

Apesar de o BFA ser degradado nos rios por bactérias, a sua meia-vida média calculada, de 3-5 dias, pode ser longa o suficiente para provocar efeitos nos organismos aquáticos. Vários estudos sugerem que o BFA não causa efeitos aos

organismos devido aos níveis muito baixos (LARSSON et al., 1999; BELFROID et al., 2002). Estudos de degradação do BFA, por processo oxidativo, foram efetuados em meio aquoso acidificado em escala laboratorial. Os valores de remoção da carga orgânica máxima obtida ficaram entre 94% e 98% (CORDEIRO, 2012).

Um estudo mostrou que os níveis de BFA determinados no fígado de peixes variaram de 2 a 75 ng g^{-1} em peso seco e no músculo dos peixes foram detectados níveis variando de 1 a 11 ng g^{-1} em peso seco; porém, a concentração de BFA na água variou de 0,01 a 0,33 ng mL^{-1}. BFA também foi detectado em peixes (1 a 6 ng g^{-1}, em peso seco) que viveram em locais onde não havia BFA (<0,18 ng mL^{-1}) na superfície da água (BELFROID et al., 2002). Larsson e colaboradores (1999) encontraram na bile de peixes, que viviam próximos a estações de tratamento de esgoto, quantidades de estrogênio de 10^4 a 10^6 vezes maior do que as encontradas na água.

O BFA pode persistir por muito mais tempo na água do mar (cerca de 30 dias); portanto, a possibilidade de contaminação de um organismo marinho por BFA pode ser mais alta do que em um organismo de água doce (KANG; KONDO, 2005; YING; KOOKANA, 2003).

Basheer e colaboradores (2004) encontraram níveis de contaminação que variaram de 13,3 a 213,1 ng g^{-1} em frutos do mar (camarão, caranguejo, lula, peixe, etc) vendidos em supermercados de Cingapura. Dessa forma, peixes de água doce e frutos do mar contaminados por BFA podem se constituir em uma rota de contaminação de humanos.

1.5.7.2 Ar

A ocorrência do BFA na fase gasosa da atmosfera é pouco provável, haja vista sua baixa pressão de vapor, porém como são liberadas mais de 100 toneladas por ano de BFA na atmosfera, durante o processo de fabricação, é possível sua presença na atmosfera, associada a partículas de aerossol (BERKNER et al., 2004).

A meia-vida de foto-oxidação do BFA varia de 0,74 a 7,4 h (STAPLES et al., 1998). Rudel e sua equipe (2001) encontraram concentrações de BFA variando de 2 a 208 ng m^{-3} em 3 de 7 amostras de ar (um local de trabalho em plásticos, uma residência e um edifício comercial).

Geralmente, a possibilidade de inalar altos níveis de BFA do ar é muito pequena. Porém, trabalhadores de companhias que produzem produtos baseados no BFA são exceções. Por exemplo, verificou-se que a concentração de BFA na urina era maior nos trabalhadores que operavam os pulverizadores de resinas epóxi do que em trabalhadores que nunca tinham entrado em contato com o BFA ou seus derivados (HANAOKA et al., 2002).

1.5.7.3 Solo

Os valores de coeficientes de adsorção ao solo (K_{oc}) para o BFA variam de 314 a 1524 quando calculados usando solubilidade em água de 120 $mg.L^{-1}$ e coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) de 3,32 (KANG; KONDO; KATAYAMA, 2006). Estes valores significam que o BFA pode ser absorvido na superfície da água ou em grandes profundidades pelo solo ou por sedimentos. De fato, os níveis de BFA determinados em sedimentos são maiores do que os encontrados em águas superficiais (BOLZ; HAGENMAIER; KÖRNER, 2001; FROMME et al., 2002; HEEMKEN et al., 2001).

Fent e colaboradores (2003), determinou em seu estudo, usando ^{14}C-BFA, que a meia vida do BFA em solo é inferior a 3 dias. A maior rota de dissipação do ^{14}C-BFA foi a formação de resíduos ligados. Contudo, a contaminação do solo por BFA pode ser correlacionada com o aumento da densidade populacional, devido ao aumento da contaminação do solo por BFA oriundo principalmente de águas de efluentes domésticos e/ou industriais (KAWAHATA et al., 2004).

1.5.7.4 Efeitos à saúde humana

O BFA causa impactos significativos no desenvolvimento de fetos de inúmeras espécies (ROY; COLERANGLE; SINGH, 1998; SAUNDERS et al., 1997). Visto que o BFA mimetiza hormônios femininos, especula-se que ele afete preferencialmente o desenvolvimento de fetos masculinos. Os danos causados pelo BFA são ao mesmo tempo graves e de grande espectro. Ratos e camundongos desenvolvem anormalidades metabólicas, reprodutivas e comportamentais. O BFA

afeta a taxa de crescimento desses animais e interfere no crescimento dos testículos, da vesícula seminal, da próstata, da uretra e do pênis. Como seria de se esperar a partir desse conjunto de anormalidades, também reduz a fertilidade desses animais. Camundongos do sexo feminino também apresentam anormalidades nas mamas e seus óvulos em desenvolvimento podem apresentar sérias anormalidades cromossômicas. O BFA também afeta o comportamento materno e o metabolismo de ratas e camundongos. Além disso, são afetados seus períodos de puberdade e seus ciclos menstruais (GOLOUBKOVA; SPRITZER, 2000).

Uma série alarmante de experimentos associou os danos causados pelo BFA em embriões de ratos a um aumento maciço de aneuploidias – um tipo específico de mutação encontrado em muitos abortos espontâneos em humanos. Em ratos, os danos na divisão celular foram causados por níveis assustadoramente baixos de BFA, justamente os níveis liberados espontaneamente, por exemplo, de gaiolas para ratos, garrafas de água, fabricadas a partir do plástico policarbonato (JENSEN et al., 1995; MILLIGAN; BALASUBRAMANIAN, 1998).

O BFA provoca alterações permanentes nas regiões do encéfalo associadas à doença de Parkinson. Também aumenta a dependência de anfetaminas em camundongos. Este mesmo trabalho sugere, ainda, que a exposição crônica ao BFA em mulheres pode predispor seus filhos a fissuras e recaídas para psicoestimulantes (ASHBY; TINWELL, 1998).

1.6 Métodos de extração

No caso de amostras aquosas, a determinação de resíduos de contaminantes ambientais usualmente é precedida por etapas de extração e pré-concentração antes de se efetuar a quantificação.

Dentre as técnicas de extração mais empregadas podem ser destacadas a extração Líquido-Líquido (ELL) e a Extração em Fase Sólida (EFS). Para a quantificação, normalmente são empregadas técnicas de separação e, dentre as mais comuns para amostras ambientais, podem ser destacadas a Cromatografia a Gás (CG) e a Cromatografia em fase Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (KOMATSU; VAZ, 2004).

1.6.1 Extração com solvente

A primeira consideração antes de qualquer cromatografia é decidir qual solvente será usado para dissolver a amostra (TOUCHSTONE, 1992).

A extração com solventes é especialmente apropriada no caso de determinações quantitativas (MENDHAM et al., 2002).

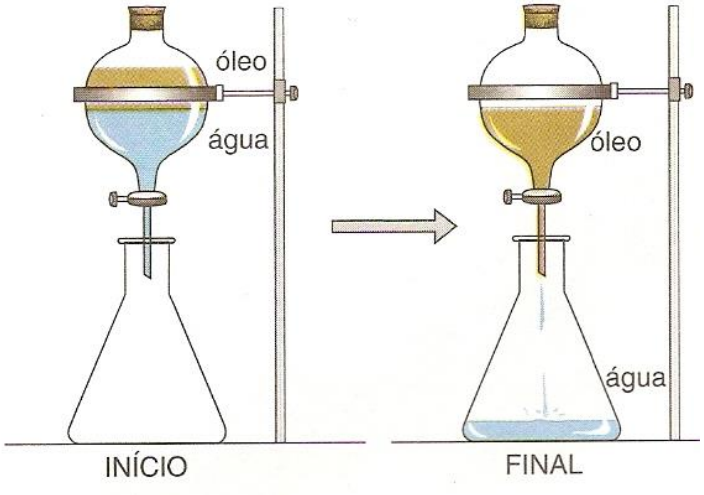
1.6.1.1 Extração Sólido-Líquido (ESL)

A extração de materiais sólidos com solventes ainda é muito usada. As técnicas mais simples são a agitação da mistura sólido-líquido, comumente com imersão do frasco em um banho-maria com ultrassom, seguida por filtração ou por centrifugação e o uso de aparelhagens de extração contínua, como o aparelho de Sohxlet (MENDHAM et al., 2002).

1.6.1.2 Extração Líquido-Líquido (ELL)

Analitos em solução ou amostras aquosas podem ser extraídos por partição direta ou com solventes imiscíveis. A ELL é baseada na solubilidade relativa do analito em duas fases imiscíveis e é determinada pelo coeficiente de equilíbrio de partição/distribuição. A extração do analito é realizada pela diferença do poder de solubilidade (polaridade) de duas fases líquidas imiscíveis. A ELL é tradicionalmente o método de extração mais comum, particularmente para compostos orgânicos em matrizes aquosas. Normalmente, um funil de separação é usado e duas fases imiscíveis são misturadas por agitação e isso possibilita a separação. Se necessário, para evitar emulsões se utiliza sal e centrifugação. A maior desvantagem da ELL é a necessidade de um grande volume de solvente orgânico. Também, devido à seletividade limitada, particularmente para análises em nível de traço, se faz necessário uma limpeza ou passos de enriquecimento/concentração do analito prévio para análise instrumental (RIDGWAY; LALLJIE; SMITH, 2007). A exemplificação da ELL pode ser vista na Figura 9.

Figura 8 - Extração Líquido-Líquido (ELL)



Fonte: HARRIS, 2005.

1.6.1.3 Extração por Fluído Supercrítico (EFSC)

A Extração por Fluído Supercrítico (EFSC) usa um fluido supercrítico como solvente de extração. O dióxido de carbono (CO_2) e o metanol aumentam a solubilidade dos analitos polares. Substâncias apolares, como os hidrocarbonetos do petróleo, podem ser extraídas com argônio supercrítico, sendo que, o processo de extração pode ser monitorado em tempo real por espectroscopia de infravermelho, pois o argônio não absorve nesta região do espectro (HARRIS, 2005).

A escolha de um fluido supercrítico, normalmente dióxido de carbono, como um solvente de extração permite uma extração mais seletiva e proporciona uma reação mais rápida do que a maioria dos líquidos. O poder de solvatação do fluido pode ser controlado, alterando-se pressão e/ou a temperatura e adicionando-se modificadores. Entretanto, a adição de outros solventes, como o metanol, diminui a seletividade do fluido supercrítico e conduz a um maior número de co-extratos, bem como uma redução na utilização de um solvente orgânico, visto que o CO_2 tem a vantagem de ser de baixo custo e não inflamável. No entanto, para análise de traços por EFSC, um alto grau de pureza de CO_2 pode ser exigido. Uma grande vantagem é que o "solvente" (fluido supercrítico) é facilmente removido da amostra matriz após extração, reduzindo a pressão. EFSC funciona melhor para sólidos em pó com boa permeabilidade, tais como solo e planta seca; já a extração de materiais aquosos, ou

amostras líquidas e soluções, podem ser difíceis. Compostos lipídicos são frequentemente extraídos juntamente com analitos de interesse e uma das principais aplicações para EFSC em alimentos é a extração de lipídios e a determinação do teor de gordura em alimentos processados (RIDGWAY; LALLJIE; SMITH, 2007).

1.6.1.4 Extração em Fase Sólida (EFS)

A preparação da amostra envolve considerável tempo e os volumes de solvente podem ser grandes. Existe um número de razões pelas quais a limpeza da amostra tem grande consideração na cromatografia. A presença de materiais diferentes do analito é provavelmente o fator mais importante que afeta o sucesso da cromatografia; desde que o sistema esteja sobrecarregado, a resolução é insatisfatória. Pelos relatos sobre a EFS, em relação à habilidade de seleção da fase sólida; esta deve ser a mais seletiva para o analito de interesse. Esta seletividade será afetada por diferentes interações entre o analito e a matriz. Entretanto, não somente um bom sorvente deve ser selecionado, mas também solventes aptos para separação mais eficaz. O tipo de sorvente usado envolve as seguintes questões:

1 – Solubilidade do analito em solventes polar ou apolar.

2 – Pode-se alterar o analito?

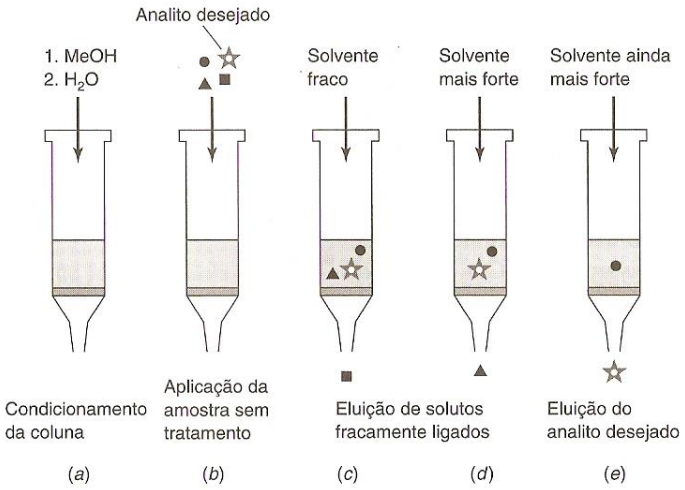
3 – O analito provém de ligação covalente?

4 – Qual é a reatividade do material estranho com o sorvente? Pode ser removido ao mesmo tempo em que sai o analito? (TOUCHSTONE, 1992)

A EFS usa um pequeno volume de uma fase estacionária cromatográfica ou um polímero especialmente moldado a partir de uma determinada molécula para isolar os analitos desejados a partir de uma amostra. A extração retira uma grande parte da matriz da amostra, o que simplifica a análise (HARRIS, 2005).

A EFS envolve partição líquido-sólido, onde a fase de extração é um sorvente sólido e tem sido usado largamente para remover e concentrar traços de materiais orgânicos de amostras líquidas ou soluções. A escolha dos solventes é realizada baseando-se nos diferentes mecanismos para extração/retenção dos analitos (RIDGWAY; LALLJIE; SMITH, 2007). O processo relacionado a este tipo de extração pode ser visto na Figura 10.

Figura 9 - Processo de Extração em Fase Sólida (EFS)

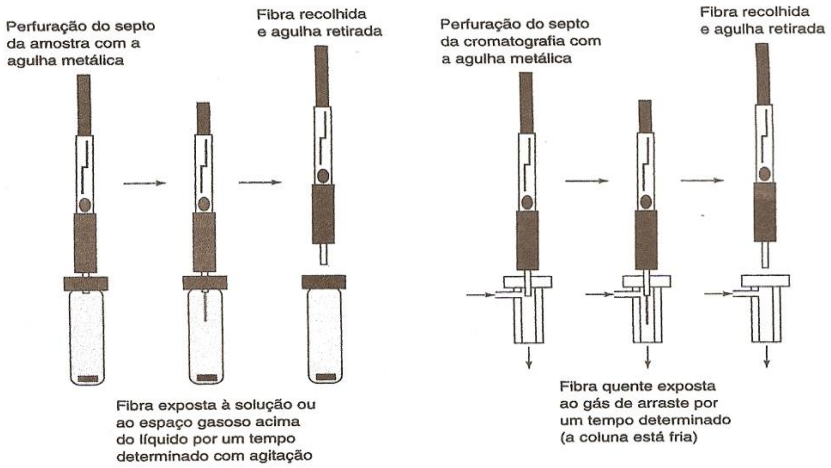


Fonte: HARRIS, 2005.

1.6.1.5 Micro Extração em Fase Sólida (MEFS)

A Micro Extração em Fase Sólida (MEFS) é um método simples para extrair compostos presentes em líquidos, no ar, ou até mesmo em sedimentos, sem a utilização de qualquer solvente. O componente principal é uma fibra de sílica fundida recoberta com um filme de espessura de 10 a 100 µm de uma fase estacionária líquida não volátil, semelhante àquela usada na cromatografia a gás (HARRIS, 2005). O esquema da MEFS pode ser visto na Figura 11.

Figura 10 - Micro extração em fase sólida (MEFS)



Fonte: HARRIS, 2005.

1.6.1.6 Adsorção

A adsorção é provavelmente o mecanismo mais conhecido e menos usado em cromatografia, apesar de a adsorção de um gás ou de um líquido na superfície de um sólido ser um processo que tem muitas aplicações científicas e comerciais. A adsorção de gases e vapores em carvão ativo, por exemplo, é usada em muitas residências para a remoção de odores nos exaustores de fogão. O carvão é utilizado em muitos processos industriais na remoção de impurezas coloridas de soluções como, por exemplo, na produção de açúcar (MENDHAM et al., 2002).

1.7 Derivação

Em uma análise orgânica convencional por CG é frequentemente conveniente trabalhar com derivados do eluído, devido a diversas razões. Em primeiro lugar, o composto é convertido em outro, permitindo ser cromatografado em fase gasosa. Em segundo lugar, o derivado é algumas vezes preparado para aumentar a sensibilidade de detecção do eluído pela substituição com grupos halogenados para detecção por captura de elétrons. Em terceiro lugar, em alguns casos, a subtração seletiva pela pré-coluna de grupos funcionais pode ser efetuada, formando derivados adequados. Em quarto lugar, e no presente contexto o mais importante, a razão para usar um derivado é proporcionar uma segunda fonte de informação, a saber, o volume de retenção do derivado, para uso em identificação do eluído a partir de dados de retenção. Deste modo a segurança de identificação é aumentada, analogamente a análise de retenção de duas colunas e também para a determinação de pontos de fusão dos derivados em análise orgânica convencional (LEATHARD; SHURLOCK, 1970).

1.7.1 Derivantes

Os derivados usuais de hidroxi-compostos são os trimetilsilil éteres, que são rapidamente formados a temperatura ambiente pela reação com hexametildisilazane. Trimetilsilil éteres frequentemente, mas não invariavelmente,

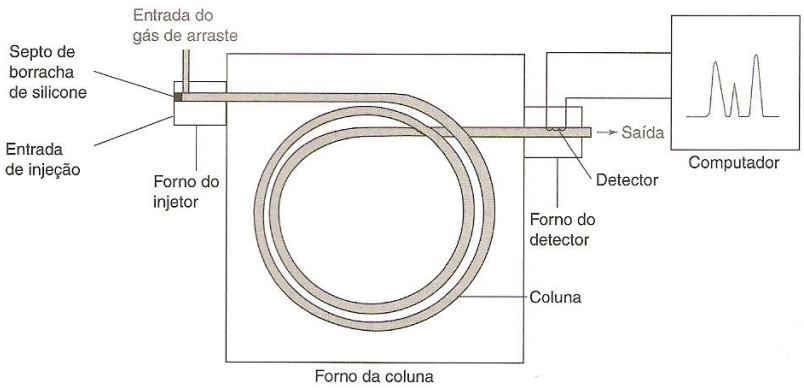
tem menor volume de retenção do que seus compostos semelhantes. Clorometilsilil éteres têm também encontrado uso em CG, particularmente para esteróides, visto que em alguns casos eles são mais estáveis do que os trimetilsilil éteres. Há derivados halogenados que também são usados para detecção por captura de elétrons. Derivados de ésteres ácidos, particularmente acetatos, de hidroxi-compostos são frequentemente usados. Eles têm vantagem superior aos trimetilsilil éteres porque eles podem ser preparados do anidrido correspondente sem a necessidade de condições de secura completa das reações. Por outro lado, a acetilação é algumas vezes mais lenta que sililação, embora os fenóis e compostos relatados sejam rapidamente acetilados. Acetatos são geralmente mais estáveis do que trimetilsilil éteres, particularmente em hidrólises. Ésteres halogenados são algumas vezes utilizados por sua alta volatilidade (LEATHARD; SHURLOCK, 1970).

1.8 Técnicas de análise

1.8.1 Cromatografia em fase Gasosa (CG)

Em CG, o analito gasoso é transportado através da coluna por uma fase gasosa móvel, conhecida como gás de arraste. A Figura 12, a seguir, mostra de forma esquemática, um cromatógrafo a gás onde uma amostra líquida volátil ou gasosa é injetada através de um septo (um disco de silicone) para dentro de uma entrada de injeção aquecida, vaporizando-se rapidamente. O vapor é arrastado através da coluna por meio de um gás de arraste (He, N_2 ou H_2) e os analitos separados fluem pelo detector, cuja resposta é observada em um computador. A coluna deve estar suficientemente aquecida para proporcionar uma pressão de vapor que possibilite a eluição dos analitos em um tempo razoável. O detector é mantido em uma temperatura maior do que a da coluna, de modo que os analitos permaneçam na forma gasosa (HARRIS, 2005).

Figura 11 - Diagrama esquemático de um cromatógrafo a gás



Fonte: HARRIS, 2005.

1.8.1.1 Colunas

A separação dos componentes da amostra é feita na coluna. A natureza do suporte sólido, o tipo e quantidade da fase líquida, o método de empacotamento, o tamanho da coluna e a temperatura são fatores importantes para a resolução desejada. A coluna é colocada em um forno controlado termostaticamente, de modo a manter a temperatura constante com a aproximação de 0,5 °C, garantindo assim condições reprodutíveis. A temperatura de operação pode variar desde a temperatura normal do laboratório até acima de 400 °C, podendo ser mantida constante durante a separação se a operação é isotérmica (MENDHAM et al., 2002).

As colunas capilares são: Colunas Capilares com Paredes Recobertas (WCOT), em que a fase estacionária é ligada diretamente à parede interna do tubo; Colunas Capilares com Suporte Recoberto (SCOT), em que uma camada de suporte sólido é depositada na parede interna do tubo e recoberta com a fase estacionária; Colunas Capilares com Camada Porosa (PLOT), em que uma camada muito fina (5 a 50 µm) de adsorvente sólido é depositada de forma homogênea na parede interna da coluna (MENDHAM et al., 2002).

1.8.1.2 Detector

A função do detector, situado na saída da coluna, é registrar e medir pequenas quantidades dos componentes da mistura separados na coluna e arrastados pelo fluxo do gás de arraste. O sinal de saída do detector alimenta um dispositivo que produz um gráfico denominado cromatograma (MENDHAM et al., 2002).

Para a escolha do detector devem-se avaliar as condições a seguir. Sensibilidade: definida como sendo a resposta do detector (mV) por unidade de concentração do analito (mg mL^{-1}); ela está intimamente relacionada ao limite de detecção (LD), porque a alta sensibilidade corresponde a um baixo limite de detecção. Linearidade: a faixa linear de resposta de um detector refere-se a faixa de concentrações na qual o sinal do detector é diretamente proporcional à quantidade (ou a concentração) do analito; a linearidade da resposta do detector acarreta a linearidade do gráfico de calibração, que pode assim, ser traçado com maior precisão. Estabilidade: uma característica importante dos detectores é a constância do sinal de saída com o tempo, supondo constante o potencial de entrada; a falta de estabilidade limita a sensibilidade do detector e pode ser observada de duas maneiras, ruído da linha de base e arraste da linha de base (MENDHAM et al., 2002).

1.8.2 Espectrometria de Massas (EM)

A EM é uma técnica usada para o estudo das massas de átomos, moléculas ou fragmentos de moléculas. Para se obter um espectro de massa, as moléculas no estado gasoso ou as espécies dessorvidas a partir de fases condensadas são ionizadas. Os íons obtidos são acelerados por um campo elétrico e separados de acordo com a razão entre sua massa e sua carga elétrica, *m/z*. Se todas as cargas forem +1, então *m/z* será numericamente igual à massa. Se, por exemplo, um íon tiver carga +2, *m/z* será ½ da sua massa (HARRIS, 2005).

Na EM que contém dois espectrômetros de massa (EM/EM), o campo do eletromagneto é fixado de tal maneira que somente íons M de massa *m* saem da fonte para a região compreendida entre o magneto e o setor elétrico. Esta região é

conhecida como a segunda região livre de campo, a primeira sendo a fonte. Alguns destes íons se decompõem e dão íons secundários de massas, m_1, m_2, m_3, etc., que têm a mesma velocidade do íon original, mas têm energias cinéticas diferentes. Estes íons podem ser focalizados sucessivamente no detector por uma varredura de voltagem do setor. Em outras palavras, o setor eletrostático age como um filtro de massas e não somente como um filtro de energia. Este procedimento permite a determinação de todos os íons secundários. Alterando de modo apropriado dos campos magnético e eletrostático, uma série de espectros de massas pode ser obtida, um para cada íon primário. Frequentemente, coloca-se uma câmara de colisão contendo um gás inerte como hélio ou argônio, por exemplo, na segunda região livre de campo para aumentar a eficiência da produção de íons secundários por colisão. A técnica é conhecida como dissociação induzida por colisão (CID) (MENDHAM et al., 2002).

1.8.3 Cromatografia a Gas acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM)

A CG/EM foi uma das primeiras técnicas associadas e é, até hoje, uma das técnicas de espectrometria de massas mais usadas e mais úteis. Hoje em dia, uma grande parte de toda a cromatografia com fase gasosa é feita em colunas capilares, predominantemente de quartzo, com a fase estacionária ligada quimicamente às paredes da coluna para evitar perdas. Estas colunas podem ser diretamente ligadas à maior parte das fontes de íons através de um anel de compressão. A coluna passa normalmente por um tubo de aço inoxidável, que a mantém na posição correta. O tubo é aquecido para evitar condensação na linha de transferência. Quando a coluna está em posição, as bombas do espectrômetro suportam vazões até 1 mL min^{-1} na coluna, mantendo ainda o vácuo adequado na fonte de íons. Muitos sistemas de CG/EM dedicados suportam as vazões da ordem de 3 a 10 mL min^{-1} usadas em capilares de grande diâmetro. Assim, a interfase física entre o cromatógrafo e o espectrômetro não é, em geral, um problema e pode-se escolher dentre diversos tipos de espectrômetros de massas (MENDHAM et al., 2002).

O espectro de massa é extremamente sensível e propicia informações de natureza tanto qualitativa como quantitativa. Com o monitoramento seletivo de íons ou o monitoramento seletivo de reações, podemos facilmente medir um componente

em um cromatograma complexo onde os compostos estão pouco separados. O monitoramento seletivo de íons diminui o limite de detecção de aproximadamente 100 vezes comparado com a varredura de *m/z*, pois o tempo de análise é gasto nos íons de interesse e não em uma varredura completa (HARRIS, 2005).

1.9 Validação

Segundo a ANVISA (2003), o objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos. A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação e exatidão, adequados à análise (ANVISA, 2003).

Segundo o INMETRO, validação é a comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram (INMETRO, 2003).

Validação é o processo de definir uma exigência analítica e confirmar que o método sob investigação tem capacidade de desempenho consistente com o que a aplicação requer (EURACHEM WORKING GROUP, 1998).

Confirmação por testes e apresentação de evidências objetivas de que determinados requisitos são preenchidos para um dado uso intencional (ISO/IEC 17025, 1999).

A validação de métodos assegura a credibilidade destes durante o uso rotineiro, sendo algumas vezes mencionado como o "processo que fornece uma evidência documentada de que o método realiza aquilo para o qual é indicado para fazer” (UPS, 1999).

Avaliação sistemática de um procedimento analítico para demonstrar que está sob as condições nas quais deve ser aplicado (WHO, 1992).

1.9.1 Especificidade e seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (ANVISA, 2003).

Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas. O mesmo significado tem sido frequentemente utilizado para o termo especificidade (RIBANI et. al, 2004).

1.9.2 Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (R) deve ser = 0,99 (ANVISA, 2003).

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação. A correlação entre o sinal medido (área ou altura do pico) e a massa ou concentração da espécie a ser quantificada muito raramente é conhecida *a priori*. Na maior parte dos casos, a relação matemática entre o sinal e a concentração ou massa da espécie de interesse deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para massas ou concentrações conhecidas dessa espécie. Essa relação matemática, muitas vezes, pode ser expressa como uma equação de reta chamada de *curva analítica*. Embora somente dois pontos definam uma reta, na prática as linhas devem ser definidas por no mínimo cinco pontos que não incluam o ponto zero na curva, devido aos possíveis erros associados (RIBANI, et.al., 2004).

1.9.3 Faixa Linear de Trabalho

A faixa linear de trabalho ou intervalo especificado é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Normalmente, é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método. É estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequadas quando aplicados a amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado (ANVISA, 2003).

1.9.4 Sensibilidade

Sensibilidade é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito. Pode ser expressa pela inclinação da curva de regressão linear de calibração (INMETRO, 2003). Sob o ponto de vista prático, a sensibilidade constitui o coeficiente angular do gráfico analítico.

$$S = \frac{dy}{dx}$$

Onde:
S = sensibilidade
dy = variação da resposta
dx = variação da concentração

Em métodos sensíveis, uma pequena diferença na concentração do analito causa grande variação no valor do sinal analítico medido. Este critério expressa a capacidade do procedimento analítico gerar variação no valor da propriedade monitorada ou medida, causada por pequeno incremento na concentração ou quantidade do analito (BRITO et al*.,* 2003).

1.9.5 Limite de Detecção (LD)

LD é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2003).

De acordo com Ribani e colaboradores (2004), o LD representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental. O LD pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica.

Método visual: utilizado para determinar o LD utilizando a matriz com adição de concentrações conhecidas da substância de interesse, de tal modo que se possa distinguir entre ruído e sinal analítico pela visualização da menor concentração visível (detectável). Este procedimento também pode ser feito através do instrumento utilizando parâmetros de detecção no método de integração.

Método da relação sinal-ruído: este método pode ser aplicado somente em procedimentos analíticos que mostram o ruído da linha de base. Para determinar a relação sinal-ruído, é feita a comparação entre a medição dos sinais de amostras em baixas concentrações conhecidas do composto de interesse na matriz e um branco (matriz isenta do composto de interesse) destas amostras. Assim, é estabelecida uma concentração mínima na qual a substância pode ser facilmente detectada. A relação sinal-ruído pode ser de 3:1 ou 2:1, proporções geralmente aceitas como estimativas do limite de detecção.

Método baseado em parâmetros da curva analítica: o LD pode ser expresso como:

$$LD = 3{,}3.\frac{s}{S}$$

onde s é a estimativa do desvio padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação e S é a inclinação ("slope") ou coeficiente angular da curva analítica.

Para calcular estes dados, uma curva analítica deverá ser feita utilizando a matriz contendo o composto de interesse na faixa de concentração próxima ao limite de detecção. Softwares como Microsoft Excel® ou Microcal Origin® podem calcular os parâmetros da curva e a estimativa do desvio padrão relativo destes parâmetros. Para adquirir melhor compreensão dos cálculos envolvidos, pode-se consultar livros de estatística.

1.9.6 Limite de Quantificação (LQ)

É a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de quantificação é um parâmetro determinado, principalmente, para ensaios quantitativos de impurezas, produtos de degradação em fármacos e produtos de degradação em formas farmacêuticas e é expresso como concentração do analito (por exemplo, porcentagem p/p ou p/V, parte por milhão) na amostra (ANVISA, 2003).

De acordo com Ribani (2004), os mesmos critérios de LD podem ser adotados para o LQ, utilizando a relação 10:1, ou seja, o LQ pode ser calculado utilizando o método visual, a relação sinal-ruído ou a relação entre a estimativa do desvio padrão da resposta (s) (que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação) e a inclinação da curva analítica (S), em níveis próximos ao LQ, a partir da equação:

$$LQ = 10.\frac{s}{S}$$

O método mais utilizado é o da relação sinal-ruído para técnicas analíticas em geral, porém em técnicas analíticas de separação, como as cromatográficas e eletroforéticas, a medição do ruído não é trivial e às vezes subjetiva (já que a curva analítica é construída com a área e não somente o sinal do detector). Além disso, tanto o LD quanto o LQ podem ser afetados pelas condições cromatográficas. Picos maiores aumentam a relação sinal-ruído, resultando em LD e LQ mais baixos. Além disso, a determinação cromatográfica desses parâmetros deve considerar tanto o

tipo quanto o tempo de uso da coluna. O melhor caminho para resolver este problema do cálculo do LD e LQ é utilizar o método baseado nos parâmetros da curva analítica, que é estatisticamente mais confiável. A curva analítica deve conter a concentração correspondente ao LQ.

1.9.7 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (ANVISA, 2003).

Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. É importante observar que um valor exato ou verdadeiro é o valor obtido por uma medição perfeita e este valor é indeterminado por natureza. A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança (ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão). Estes limites podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis de traços (RIBANI et al., 2004).

1.9.8 Precisão

Conforme a ANVISA (2003), a precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em três níveis:

a) Repetibilidade (precisão intracorrida): concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação;

b) Precisão intermediária (precisão intercorridas): concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes;

c) Reprodutibilidade (precisão interlaboratorial): concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica, por exemplo, para

inclusão de metodologia em farmacopeias. Estes dados não precisam ser apresentados para a concessão de registro.

A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas. A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), segundo a fórmula,

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \text{ x } 100$$

em que, DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada (ANVISA, 2003).

De acordo com Ribani (2004), precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. A precisão é avaliada pelo desvio padrão absoluto (δ), que utiliza um número significativo de medições, normalmente maior que 20. Na prática, em validação de métodos, o número de determinações é geralmente pequeno e o que se calcula é a estimativa do desvio padrão absoluto (S) (RIBANI et al., 2004).

$$S = \sqrt{\sum \frac{(x - \bar{x})^2}{N - 1}}$$

Outra expressão da precisão é através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV) (RIBANI et al., 2004).

$$CV\% = \frac{S}{\bar{X}}$$

1.9.9 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança

durante o uso normal. Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez. Constatando-se a susceptibilidade do método às variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento (ANVISA, 2003).

De acordo com o INMETRO, a robustez de um método (*robustness*) mede a sensibilidade que este apresenta em face de pequenas variações. Diz-se que um método é robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros. A robustez de um método cromatográfico é avaliada, por exemplo, pela variação de parâmetros como a concentração do solvente orgânico, pH e força iônica da fase móvel em CLAE, programação da temperatura, natureza do gás de arraste em CG, bem como o tempo de extração, agitação, etc. As mudanças introduzidas refletem as alterações que podem ocorrer quando um método é transferido para outros laboratórios, analistas ou equipamentos (RIBANI et al., 2004).

1.10 Legislação no Brasil

A preocupação sobre o uso do BFA tem crescido internacionalmente. O Canadá tornou-se o primeiro país a tornar ilegal a substância, em setembro de 2010, apesar da oposição da indústria. França e Dinamarca baniram o BFA pouco depois. O governo dinamarquês chegou a proibir o uso do produto em qualquer alimento para crianças de até três anos de idade.

Por precaução, alguns países, inclusive o Brasil, optaram por proibir a importação e fabricação de mamadeiras que contenham BFA, considerando a maior exposição e susceptibilidade dos indivíduos usuários deste produto. Esta proibição está vigente desde janeiro de 2012 e foi feita por meio da Resolução RDC n. 41/2011. Assim, mamadeiras em policarbonato não podem ser comercializadas no Brasil.

Para as demais aplicações, o BFA ainda é permitido, mas a legislação estabelece limite máximo de migração específica desta substância para o alimento que foi definido com base nos resultados de estudos toxicológicos sendo este limite de 0,6 mg para cada quilo de embalagem (ANVISA, 2003).

1.11 Métodos de análise

Métodos analíticos têm sido descritos na literatura, para a determinação do BFA em águas de rio (GHISELlI, 2006; HEEMKEN et al., 2001; INOUE et al., 2002a; JIN et al., 2004; KANG; KONDO, 2005; KAWAGUCHI et al., 2005; KAWAGUCHI et al., 2006; KAWAHATA et al., 2004; LIU; ZHOU; WILDING, 2004; NAKAMURA; DAISHIMA, 2004; RODRIGUEZ-MOZAZ; BARCELÓ, 2004), mar (BASHEER et al., 2005; HEEMKEN et al., 2001; KANG; KONDO, 2005; LIU; ZHOU; WILDING, 2004), potável (BOLZ; KÖRNER; HAGENMAIER, 2000; GHISELLI, 2006; INOUE et al., 2002a; RODRIGUEZ-MOZAZ; BARCELÓ, 2004), esgoto (BOLZ; GHISELE, 2006; BOLZ; KÖRNER; HAGENMAIER, 2000; BOLZ; HAGENMAIER; KÖRNER, 2001; FROMME et al., 2002), sedimentos de rios (BOLZ; HAGENMAIER; KÖRNER, 2001; FROMME et al., 2002; KAWAHATA et al., 2004) e em amostras biológicas, tais como:saliva (ATKINSON et al., 2002; VÍLCHEZ et al., 2001), urina (YOSHIMURA et al., 2002; OUCHI; WATANABE, 2002), sêmen (INOUE et al., 2002b), leite (MARAGOU, 2006), soro e plasma (INOUE et al., 2000; INOUE et al., 2001; KURODA et al., 2003; SAJIKI; TAKAHASHI; YONEKUBO, 1999; YOSHIMURA et al., 2002; KOSARAC et al., 2012), utilizando-se diferentes técnicas e procedimentos analíticos na tentativa de avaliar a exposição humana.

Diversas técnicas de extração e purificação vêm sendo empregadas na análise de BFA conforme a matriz em estudo, sendo as mais comumente encontradas: ~~a~~ EFS (BALLESTEROS et al. 2006; GATIDOU et al., 2007; INOUE et al., 2002a; YOSHIMURA et al., 2002) e ELL (del OLMO et al., 1997; VÍLCHEZ et al., 2001; ZAFRA et al., 2002). Entre as técnicas menos frequentemente aplicadas estão: a extração com carvão ativado (YOON et al., 2003), a MEFS (del OLMO et al., 2005) e a extração sortiva em barra de agitação (KAWAGUCHI et al., 2005; NAKAMURA; DAISHIMA, 2004; YANG et al., 2011; LIU et al., 2013).

Na detecção e quantificação do analito são empregadas, CLAE com detector UV (INOUE et al., 2002a), fluorescência (YOON et al., 2003) ou EM (RODRIGUEZ-MOZAZ; BARCELÓ, 2004) e técnicas eletroquímicas (SCHWARTZ-MITTELMAN et al., 2005). No entanto, Cromatografia a Gás acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) vem sendo uma das técnicas de detecção e quantificação mais utilizada na análise de BFA (BALLESTEROS et al., 2006; del OLMO et al., 1997; del OLMO et

al., 2005; GATIDOU et al., 2007; KAWAGUCHI et al. 2005; VÍLCHEZ et al., 2001; YOSHIMURA et al., 2002; ZAFRA et al., 2002).

Trabalhos mais recentes demonstram a preocupação com os danos causados pelo BFA e suas fontes de contaminação. Os dados referentes a estes trabalhos podem ser vistos na Tabela 5.

Tabela 5 - Métodos recentes, encontrados na literatura, de determinação de BFA em diversas matrizes

Matriz	Preparo da amostra	Detecção	Dados cromatográficos	Exatidão	LD e LQ	BFA encontrado	Referência
Águas superficiais e residuais	EFS: C_{18}	CL-UV	FM: água-acetonitrila 50:50% (%, v/v) MS: Eluição com gradiente C: Kromasil C_{18} (25 cm x 4,6 mm)	72	LQ = 5 µg L^{-1}	0,8 – 26,1 5 µg L^{-1}	GE et al., 2010
Leite empacotado	EFS: C_{18}	CL-UV	FM: metanol-água 50:50% (%, v/v) MS: Eluição isocrática C: Waters (250 mm x 4,6 mm x 10 µm)	97 – 102	LD: 0,039 µg cm^{-3}	0,5 – 1014 mg dm^{-3}	HADJMOHAMMA ; SAEIDI, 2010
Água de mar	Microextração líquido-líquido Microextração em gota única	CL-UV	FM: água-acetonitrila 50:50% (%, v/v) MS: Eluição com gradiente C: ResElut (150 mm x 4,6 mm x 5 µm)	92,9 – 118 102 - 118	LD: 0,7 ng mL^{-1} LD: 15 ng mL^{-1}	-	LÓPEZ-DARIAS et al., 2010
Mamadeira	Extração com diclorometano	CL-FL	FM: acetonitrila–água 70:30% (%, v/v) MS: Eluição isocrática C: Waters C_{18} (150 mm x 4,6 mm)	97 – 100	LD: 0,1 ng mL^{-1}	0,13 – 18,5 ng mL^{-1}	NAM; SEO; KIM, 2010

Tabela 5 - Métodos recentes, encontrados na literatura, de determinação de BFA em diversas matrizes (continuação)

Matriz	Preparo da amostra	Detecção	Dados cromatográficos	Exatidão	LD e LQ	BFA encontrado	Referência
Água (torneira, rio e efluente)	Microextração líquido-líquido	CL-FL	FM: acetonitrila-água 80:20% (%, v/v) MS: Eluição isocrática C: Nucleosil C_{18} (150 mm x 2,0 mm x 5 µm)	63 – 111	LD: 0,02 µg L^{-1}	0,14 – 0,28 µg L^{-1}	YANTZI et al., 2010
Alimento enlatado	MEFS	CG-EM	SLB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)	84 – 112	LD: 0,01 ng mL^{-1} LQ: 0,033 ng mL^{-1}	0 – 77,7 ng g^{-1}	VIÑAS et al., 2010
Óleo comestível	Microextração líquido-líquido	CL-DAD	FM: hexano-metanol 60:40 (%, v/v) MS: Eluição com gradiente C: Waters Xterra C_{18} (15 cm x 4.6 mm x 5 µm)	89.5 – 99.7	LD: 3,6 ng g^{-1} LQ: 11,8 ng g^{-1}	0,2 – 1 µg g^{-1}	LIU et al., 2013
Água do mar	Microextração líquido-líquido	CL-EM	FM: metanol água 20:80 (%, v/v) MS: Eluição com gradiente C: Hypersil Gold C_{18} (15 cm x 2,1 mm x 3 µm)	84 - 104	LD: 0,005 – 0.03 g L^{-1}	0.035 g L^{-1}	GONZÁLES et al., 2011
Peixes	Extração liquido-líquido	CL-EM/EM	FM: DCM metanol 90:10 (%, v/v) MS: Eluição com gradiente C: Agilent Enviro-Prep (30 cm x 21,1 mm x 10 µm)	40 - 103	LD: 0.002 – 3.09 ng g^{-1}	223,91 ng g^{-1}	JAKIMSKA et al., 2013

Tabela 5 - Métodos recentes, encontrados na literatura, de determinação de BFA em diversas matrizes (continuação)

Matriz	Preparo da amostra	Detecção	Dados cromatográficos	Exatidão	LD e LQ	BFA encontrado	Referência
Saliva e urina	Extração líquido-líquido	CL-EM	-	-	LD: 0,1 ng mL^{-1}	0,39 – 0,66 ng mL^{-1}	KINGMAN, 2012
Cordão umbilical	Extração Liquid-líquido	CG-EM	Zebron ZB-5HT (30 m x 0,025 mm x 1 µm)	65 - 88	LD: 0,087 ng mL^{-1}	0,023 – 10,43 ng mL^{-1}	KOSARAC et al., 2012
Talheres de policarbonato	MEFS	CG-EM	Agilent HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)	114 – 150	LD: 2.65 – 4,71 ng mL^{-1}	104,7 – 181,5 ng mL^{-1}	OCA et al., 2013
Alimento enlatado	CL-DAD		FM: acetonitrila agua 10:90 (%, v/v) MS: Eluição com gradiente C: Inertsil ODS-3 (25 cm x 4.6 mm x 5µm)	-	-	36,5 – 554,8 ng g^{-1}	SUNGUR; KOROGLU; OZKAN, 2013
Urina	Extração liquido-líquido	CL-EM/EM	FM: água-acetonitrila 5:95 (%, v/v) MS: Eluição com gradiente C: Thermo Betasil (50 mm x 2.1 mm x 3 µm)	94,3 – 100,3	LD: 0.1 ng mL^{-1} LQ: 0,3 ng mL^{-1}	2,2 ng mL^{-1}	CHEN et al., 2012

FM = Fase móvel, MS = Método de separação, C = Coluna, ND = Não detectado, LD = Limite de detecção, LQ = Limite de quantificação.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a presença de BFA em saliva humana.

2.2 Objetivos específicos

Desenvolver e validar um método de análise de BFA em saliva, utilizando-se derivação com N O-Bis-(trimetilsilil) trifluroacetamida (BSTFA), ELL e análise por CG-EM.

Aplicação do método em amostras de saliva humana antes e depois do tratamento dentário.

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Limpeza da vidraria

O material utilizado foi deixado de molho em solução de Extran 5% (MA-02-neutro, Merck) por 24 h e enxaguado em água corrente seguido de enxague com água destilada. A secagem da vidraria foi realizada em estufa a 40ºC. Após a secagem, o material foi novamente enxaguado com metanol (J. T. Baker, grau HPLC) para remoção de possíveis traços de BFA e secos novamente em estufa a 40ºC. O material volumétrico foi seco a temperatura ambiente. Para todos os procedimentos foram utilizadas vidrarias sem material plástico, visto a possível contaminação pelo BFA.

3.2 Coleta das amostras

As amostras de saliva foram coletadas de um único consultório localizado na cidade de Campo Grande – MS. Foram coletadas amostras de saliva, de pacientes submetidos a tratamento dentário com resinas a base de BFA, imediatamente antes e após o tratamento, 1 h e 2 h após o tratamento, sendo estas levadas à extração na sequência. As coletas foram feitas em um único recipiente para cada horário e depois fracionadas em 3 alíquotas. Fatores que poderão afetar os resultados das análises serão considerados, tais como: identificação do dente, quantidade de dentes submetidos a tratamento, idade do paciente, restauração recente com resina.

3.3 Amostra testemunha

Várias amostras de saliva foram testadas, até se encontrar uma isenta de BFA, para ser utilizada como amostra testemunha nos ensaios preliminares de recuperação. Foram testadas amostras de saliva de pessoas que não passaram por

processos odontológicos, utilizando resinas, nos últimos anos. Essas amostras foram escolhidas como testemunhas, pois não apresentaram traços de BFA.

3.4 Padrões, reagentes e soluções

Solução estoque de BFA (Aldrich, 95%) na concentração de 109 $mg.L^{-1}$ e soluções de trabalho nas concentrações de 1,0 e 10,0 $mg.L^{-1}$, foram preparadas em etanol (Vetec, 95%).

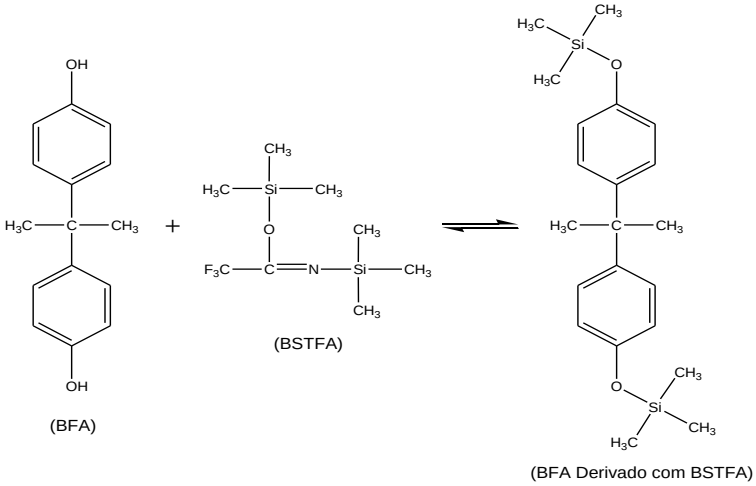
O processo de derivação do BFA foi realizado com N O-Bis-(trimetilsilil) trifluroacetamida (BSTFA) contendo 10% de trimetilclorosilano (Fluka, 99%).

O acetato de etila e o hexano, utilizados foram da J. T. Baker, grau HPLC e o diclorometano (DCM) da Mallinckrodt, grau HPLC.

3.5 Derivação do BFA

Alíquotas de solução estoque e de trabalho foram transferidas para *vials* de 2 mL e secas sob fluxo de N_2, sendo então adicionados 10,0 µL de BSTFA e 200,0 µL de DCM. Em seguida, os *vials* foram fechados, agitados por 30 s e colocados em estufa a 40º C por 10 min para que a reação de derivação ocorresse. As amostras foram então secas sob fluxo de N_2, retomadas a 1,0 mL com DCM e injetadas no CG-EM (ZAFRA et al., 2003). A Figura 13 mostra a reação de derivação do BFA com BSTFA.

Figura 12 - Reação de derivação do BFA com BSTFA



Fonte: ZAFRA, 2002.

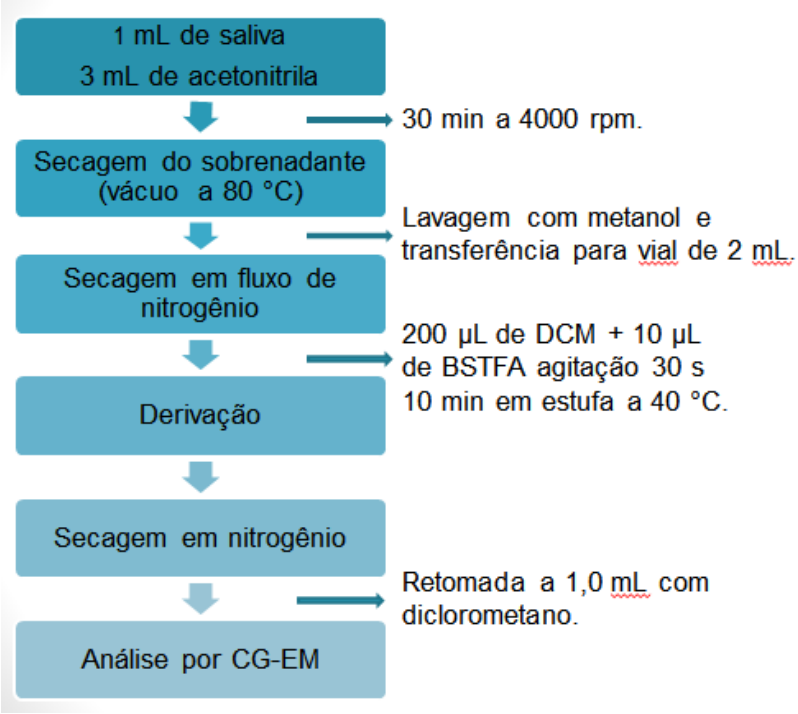
3.6 Extração do analito

Inicialmente foi efetuado levantamento de artigos da literatura que relacionam: BFA, alteradores endócrinos, saliva, água, efeitos ao meio ambiente e a saúde humana e métodos de análise.

A extração do analito foi efetuada por ELL. A princípio efetuaram-se vários testes de extração, utilizando-se solventes diferentes como: acetonitrila, metanol, clorofórmio e hexano. O solvente que obteve melhor resultado na extração foi a acetonitrila.

Em tubo de ensaio, 3 mL de acetonitrila foram colocados em 1 mL de saliva e, na sequência, centrifugados durante 30 min a 4.000 rpm, para que ocorresse precipitação das proteínas presentes na saliva. Transferiu-se o sobrenadante para um frasco e secou-se em estufa a vácuo a 80°C. Na sequência, o frasco foi lavado com metanol e o analito transferido para um *vial* de 2 mL. O extrato presente no *vial* foi seco fluxo de N_2 e a derivação efetuada adicionando-se ao *vial* 200,0 µL de DCM e 10,0 µL de BSTFA, sendo o *vial* agitado por 30 s e mantido durante 10 min em estufa a 40º C. Em seguida, a amostra foi seca novamente sob suave fluxo de N_2, retomada a 1,0 mL com DCM e analisada por CG-EM. O fluxograma do processo de extração pode ser visto na Figura 14.

Figura 13 - Fluxograma do processo de extração



Fonte: Elaborada pelo autor, 2013.

3.6.1 Otimização do processo de extração

A otimização do processo de ELL foi realizada variando volume do solvente de extração, volume do analito, solventes utilizados na extração e tempo de centrifugação. A secagem do analito e posterior lavagem do frasco utilizado na secagem sofreu variações para sua otimização.

3.6.2 Análises

As análises foram efetuadas em Cromatógrafo a Gás de Alta Resolução GC 2010 acoplado a Espectrômetro de Massas QP-2010 Plus (Shimadzu), equipado com injetor automático AOC-20i, equipamento lotado no Instituto de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (INQUI/UFMS). A coluna cromatográfica utilizada foi Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) da Restek. O gás de arraste foi o hélio 5.0 analítico da White Martins e o volume de injeção foi de 1 µL, no modo sem divisão (*splitless*).

A varredura de íons no modo *SCAN* variou de *m/z* 60 a 500. Os espectros foram obtidos pela técnica de impacto eletrônico, com energia de 70 eV. Para a geração dos cromatogramas, dos fragmentogramas e quantificação dos analitos foi utilizado o *software* GCMS Solutions da Shimadzu.

3.7 Estudos preliminares

3.7.1 Avaliação do sistema cromatográfico

O desempenho do sistema analítico (CG-EM) foi avaliado com soluções padrão do analito, submetidas a processo de derivação com BSTFA. Dessa forma, foi determinada a resposta do equipamento quanto à linearidade, limites de detecção e de quantificação.

3.7.2 Otimização do processo de derivação

A otimização do processo derivação do BFA foi realizada variando parâmetros como volume do agente derivante (BSTFA), temperatura e tempo de estufa. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.7.3 Condições cromatográficas

Na análise de BFA, por CG-EM com derivação, manteve-se a temperatura do injetor e da interface em 260°C e 270°C, respectivamente. A coluna foi mantida na temperatura de 120°C durante 2 min, na sequência elevou-se até 210°C, com uma taxa de aquecimento de 15ºC min^{-1} e, em seguida, elevou-se até 280°C com uma taxa de 10ºC min^{-1}, mantendo-se a 280°C nos 3 min finais da análise. A

pressão da coluna manteve-se a 89,9 KPa, a vazão do gás de arraste em 1,10 mL min^{-1}, sendo o tempo de análise de 18 min.

3.7.4 Construção das curvas analíticas

Para determinar a equação da reta e a sensibilidade do CG-EM, curva analítica foi traçada a partir de soluções padrão de concentrações conhecidas, submetidas ao processo de derivação com BSTFA. Para construção da curva analítica do BFA, foram preparadas e analisadas, em triplicata, soluções padrão nas concentrações de 10, 30, 50, 70 e 100 ng mL^{-1}.

3.8 Parâmetros de validação

3.8.1 Seletividade

A seletividade foi avaliada pela comparação do cromatogramas obtidos da aplicação do método a uma amostra fortificada com 30 ng L^{-1} de BFA com o branco e com a amostra testemunha. O branco consistiu da aplicação do método sem a amostra, ou seja, corresponde à avaliação dos reagentes e solventes usados nas análises da testemunha e das amostras fortificadas.

3.8.2 Limites de detecção e quantificação

Os LD e LQ do equipamento foram determinados pela relação sinal:ruído da linha de base, empregando a solução de trabalho de 1,0 mg L^{-1}. Essa solução foi diluída com diclorometano e injetada até se obter um sinal referente ao analito com uma altura média igual a três (LD) e dez (LQ) vezes a altura média referente ao ruído.

3.8.3 Linearidade e faixa linear de trabalho

Para verificar a linearidade e faixa linear de trabalho foi escolhido um intervalo variando de 1 a 10 vezes o valor do LQ do equipamento. Volumes pré-determinados de padrão BFA (1,0 mg L^{-1}) foram transferidos para vial de 2 mL, secos sob fluxo de nitrogênio e submetidos à derivação. Cada amostra foi injetada 5 vezes para obtenção da área média de cada ponto.

3.8.4 Sensibilidade

A sensibilidade é a capacidade do método em distinguir, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas. Sob o ponto de vista prático, a sensibilidade constitui o coeficiente angular da curva analítica e foi determinada simultaneamente aos testes de linearidade (BRITO et al., 2003).

3.8.5 Ensaios de recuperação

O estudo da recuperação consiste na fortificação da amostra, ou seja, na adição de soluções com diferentes concentrações do analito de interesse. Em seguida, realiza-se a determinação da concentração do analito adicionado. Calcula-se a quantidade percentual recuperada pelo método através da Equação 1 (BRITO et al., 2003)

Os ensaios de recuperação serão utilizados para avaliar a precisão [através do CV(%)] e exatidão [através da Rec(%)] do método, visto que estes fornecem todos os parâmetros necessários para a avaliação destas variáveis.

As amostras foram fortificadas em 3 níveis de concentração (1, 3 e 5 vezes o LQ) com 5 replicatas em cada nível e submetidas ao procedimento analítico. As recuperações e os coeficientes de variação foram calculados de acordo com as fórmulas indicadas a seguir.

$$\text{Rec}\ (\%) = \frac{|\text{valor obtido} - \text{valor real}|}{\text{valor real}} \times 100 \qquad \text{(Equação 1)}$$

$$\text{CV}(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \qquad \text{(Equação 2)}$$

Onde: s = desvio padrão das recuperações e $\bar{x}$ = média das recuperações.

3.9 Análise das resinas

Para verificar a lixiviação do BFA nas resinas dentárias, amostras das resinas mais utilizadas no mercado, polimerizadas, foram pesadas e submetidas ao processo de extração descrito anteriormente para as amostras de saliva (Figura 14). As resinas escolhidas para procedimento odontológico dos pacientes e posterior análise da saliva dos mesmos foram escolhidas pela cirurgiã-dentista, que se baseou no tipo e localização dos dentes a serem tratados.

3.9.1 Amostras de saliva

Amostras de saliva, de pacientes que passaram pelo tratamento dentário com resinas a base de BFA, foram submetidas ao processo de extração descrito em 3.6 e analisadas pelo método descrito anteriormente em 3.7.3.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Estudos preliminares

4.1.1 Determinação dos parâmetros cromatográficos

Para a verificação do tempo de retenção e obter o espectros de massa do BFA, partindo das soluções estoque, foram preparadas soluções de BFA, com derivação, na concentração de 5,0 ng mL^{-1} para injeção no modo *SCAN*. O cromatograma e espectro obtido são apresentados nas Figuras 15 e 16.

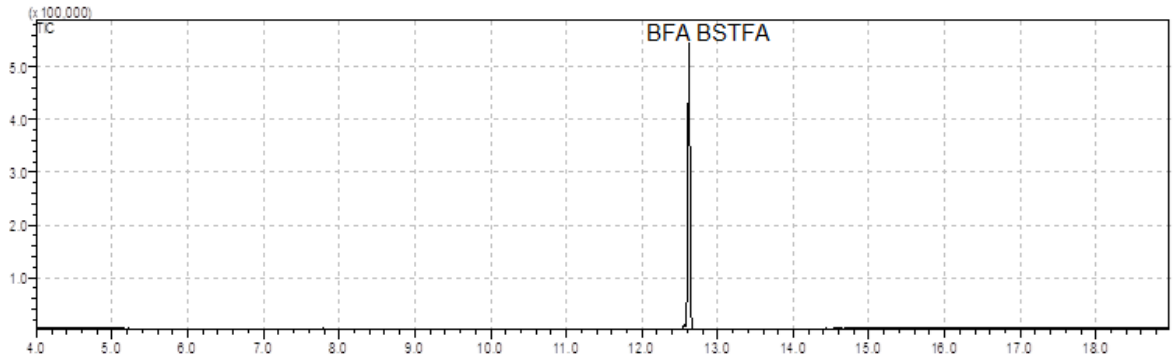
Na Tabela 6 são apresentados os tempos de retenção e os íons que foram escolhidos para serem monitorados na análise no modo *SIM.*

Tabela 6- Tempo de retenção e íons monitorados para o BFA com derivação

BFA	**Tempo de Retenção (min)**	**Íons monitorados (*m/z*)**
Derivado com BSTFA	12,5	357 e 372

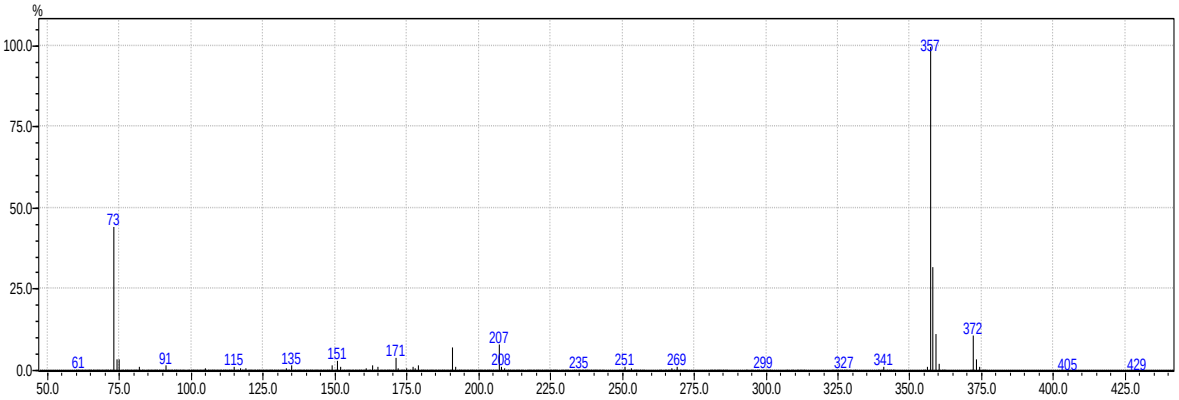
Fonte: Elaborada pelo autor, 2012.

Figura 14 - Cromatograma obtido no modo SCAN pela injeção de 1,0 μL de solução (5,0 ng mL^{-1}) padrão de BFA derivado com BSTFA



Fonte: *Print screen* da aplicação no sistema operacional do equipamento, 2012.

Figura 15 - Espectro de massas obtido do BFA na concentração de 5,0 mg L^{-1} e derivado com BSTFA



Fonte: *Print screen* da aplicação no sistema operacional do equipamento, 2012.

4.1.2 Extração e purificação

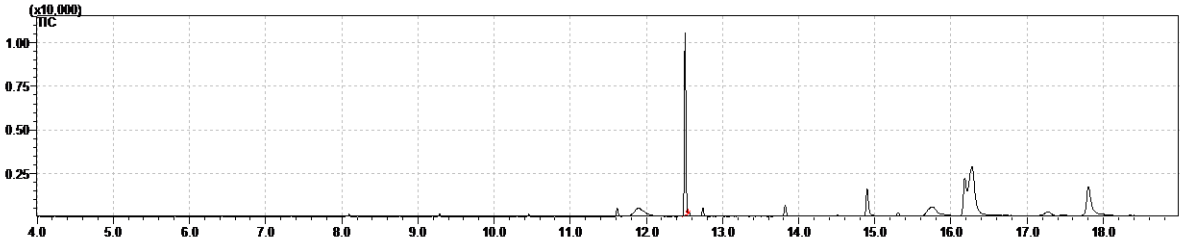
Para a otimização da extração, testes de recuperação em triplicata foram efetuados em amostras de saliva. Amostras fortificadas com 50 ng mL^{-1} foram submetidas ao processo de extração com acetonitrila, hexano, metanol, clorofórmio e acetato de etila. Os cromatogramas de cada uma delas podem ser vistos nas Figuras 17, 18, 19, 20 e 21 respectivamente e os valores das recuperações podem ser encontrados na Tabela 7. Os valores das recuperações foram calculados pela curva analítica fornecida no tópico 4.1.4.

Tabela 7- Recuperação obtida em diversos solventes utilizados na extração do BFA

Solvente utilizado na extração	**Recuperação (%)**
Acetonitrila	97
Metanol	73
Clorofórmio	3
Hexano	ND
Acetato de etila	ND

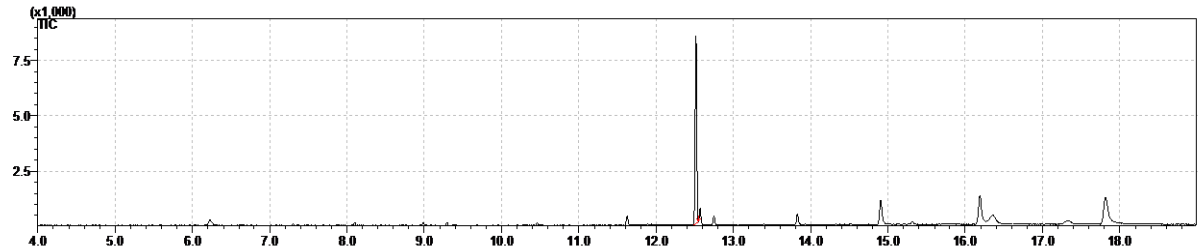
Fonte: Elaborada pelo autor, 2012.
ND = Não detectado.

Figura 16 - Cromatograma do BFA, utilizando acetonitrila como solvente extrator



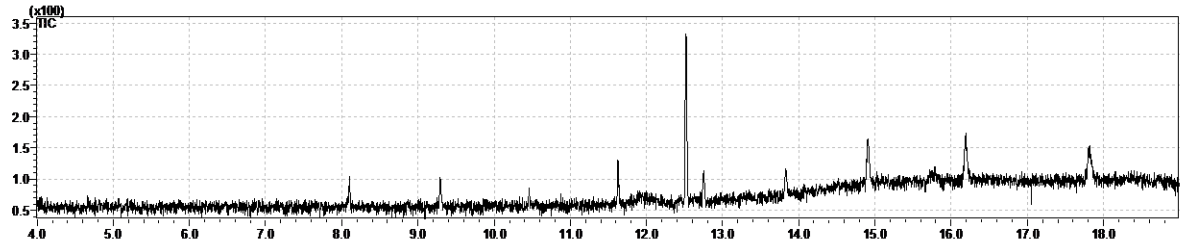
Fonte: *Print screen* da aplicação no sistema operacional do equipamento, 2012.

Figura 17 - Cromatograma do BFA, utilizando metanol como solvente extrator



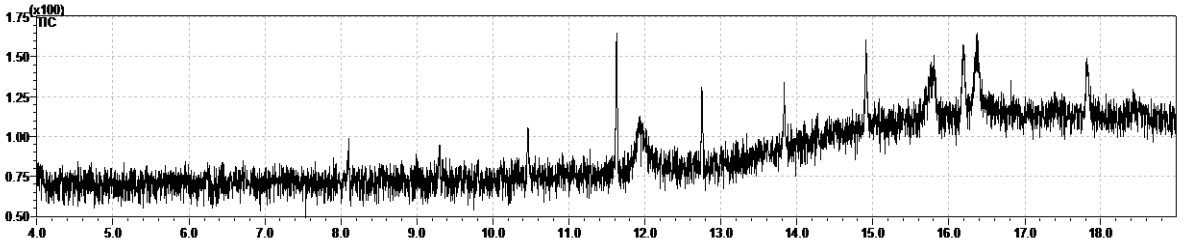
Fonte: *Print screen* da aplicação no sistema operacional do equipamento, 2012.

Figura 19 - Cromatograma do BFA, utilizando clorofórmio como solvente extrator



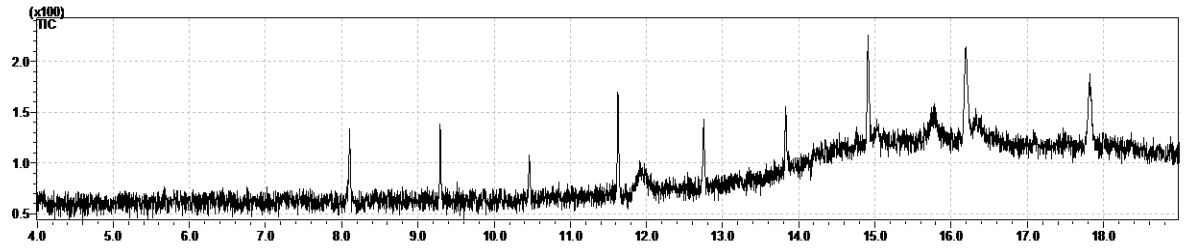
Fonte: *Print screen* da aplicação no sistema operacional do equipamento, 2012.

Figura 18 - Cromatograma do BFA, utilizando hexano como solvente extrator



Fonte: *Print screen* da aplicação no sistema operacional do equipamento, 2012.

Figura 21 - Cromatograma do BFA, utilizando acetato de etila como solvente extrator



Fonte: *Print screen* da aplicação no sistema operacional do equipamento, 2012.

De acordo com os dados dispostos na Tabela 7, nota-se que a acetonitrila apresentou resultado superior aos demais solventes utilizados na extração, e por isso foi escolhido como solvente para ser utilizado na ELL. É possível que, devido a grande variedade de substâncias presentes na saliva, que possuem propriedades químicas diferentes, alguns dos solventes não apresentaram valores de recuperação, como é o caso do hexano e acetato de etila.

4.1.3 LD e LQ do equipamento

O LD e LQ referentes ao equipamento foram determinados conforme descrito no tópico 3.8.2 e estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8- LD e LQ para o BFA com derivação

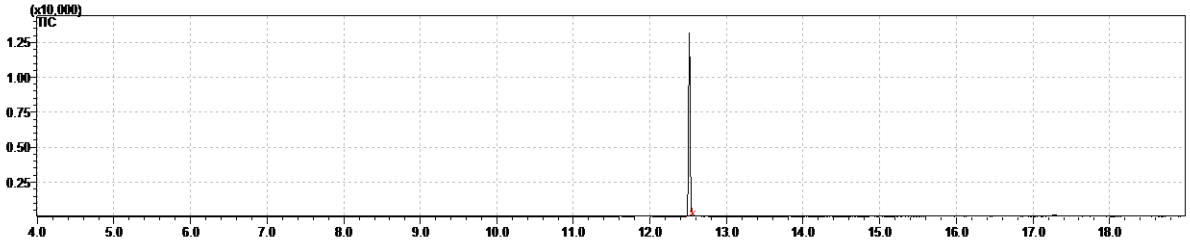
BFA	LD (ng mL^{-1})	LQ (ng mL^{-1})
Derivado com BSTFA	3,5	10,0

Fonte: Elaborada pelo autor, 2012.

De acordo com os dados da Tabela 8, verifica-se uma alta detectabilidade, semelhante aos valores encontrados por (LIU et al., 2013), obtida para o BFA derivado com BSTFA, estando o LD e LQ igual a 3,5 ng mL^{-1} e 10,0 ng mL^{-1} respectivamente.

A Figura 22 apresenta o cromatograma obtido, no modo *SIM,* pela injeção de padrão BFA derivado com BSTFA em concentração equivalente a cinco vezes o valor do LQ determinado.

Figura 19 - Cromatograma obtido no modo *SIM* pela injeção de 1,0 μL de solução (50 ng mL^{-1}) padrão de BFA derivado com BSTFA



Fonte: *Print screen* da aplicação no sistema operacional do equipamento, 2012.

4.1.4 Linearidade

A curva analítica foi construída no intervalo de 10 a 100 ng mL^{-1} para o BFA derivado com BSTFA.

O resultado da equação obtida pela regressão linear da curva analítica, y = bx + a, e seu respectivo coeficiente de correlação (R) pode ser visto na Tabela 9. A curva analítica obtida do BFA com derivação é apresentada na Figura 23.

Tabela 9 - Curva analítica obtida pela análise do BFA derivado

BFA	Curva analítica	R
Derivado com BSTFA	y = 369,03x – 1347,6	0,9909

Fonte: Elaborada pelo autor, 2013.

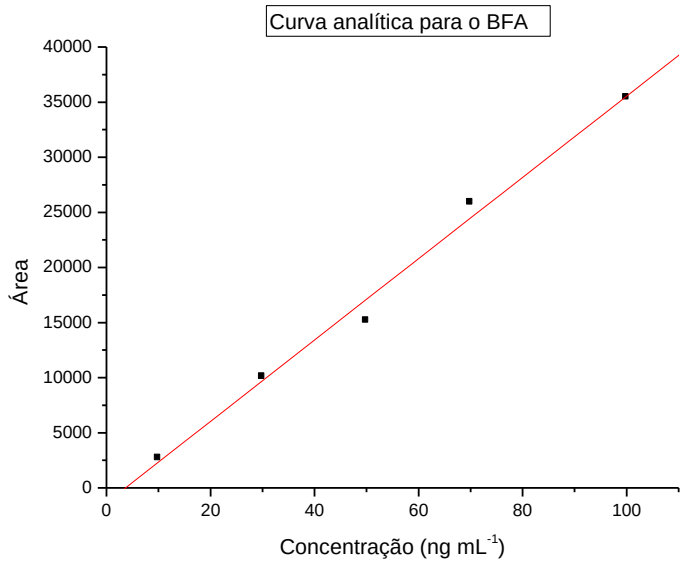
Nota-se que um bom coeficiente de correlação foi obtido para a análise, indicando uma forte correlação entre os valores de área obtidos com as concentrações utilizadas e boa linearidade nos intervalos estudados. Através do coeficiente angular da curva, é possível identificar que a análise do BFA com derivação com BSTFA apresenta boa sensibilidade. As médias das áreas obtidas dos padrões, nas concentrações descritas, podem ser vistas na Tabela 10.

Tabela 10 - Áreas obtidas na integração dos cromatogramas de padrões de BFA

Concentrações (ng mL^{-1})	Média da Área
10	2699
30	10059
50	15146
70	25895
100	35410

Fonte: Elaborada pelo autor, 2013.

Figura 20 - Curva analítica para o BFA com derivação



Fonte: Elaborada pelo autor, 2013.

Pela Figura 23, observa-se que a linearidade foi adequada para a condição estudada, conforme o coeficiente de correlação (Tabela 9).

Quanto à sensibilidade, o método com derivação apresenta boa sensibilidade.

A detectabilidade obtida, derivando-se o BFA com BSTFA, de acordo com os LD mostrados na Tabela 8, apresentou valores excelentes para a análise cromatográfica.

Em consequência, as análises por CG-EM do BFA foram efetuadas derivando-se os analitos com BSTFA, pois esta técnica apresentou boa linearidade, sensibilidade e detectabilidade.

4.2 Determinação de BFA em saliva humana

Para determinação do BFA em saliva humana por CG-EM foram utilizadas as condições cromatográficas descritas no tópico 3.7.3 e o método de extração descrito anteriormente.

4.2.1 Considerações sobre o método de extração

Na literatura são poucos os trabalhos que utilizam a (ELL) na extração de BFA, sendo que os dados fornecidos são muito discrepantes e não fornecem dados referentes a escolha do solvente, como pode ser visto nos trabalhos realizados por (JAKIMSKA et al., 2013; CHEN et al., 2012; KINGMAN, 2012).

. Com os testes realizados, fica claro que o melhor solvente para extração, no caso da saliva humana, é a acetonitrila.

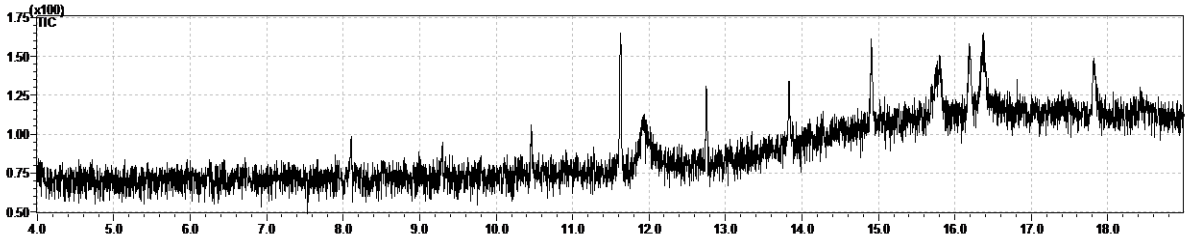
4.3 Validação do método de análise de BFA em saliva

4.3.1 Seletividade

Analisando os cromatogramas da amostra testemunha, do branco e da amostra fortificada com 50 ng mL^{-1} de BFA (Figuras 24, 25 e 26), é possível identificar que não existem picos cromatográficos com tempos de retenção iguais ou próximos ao BFA. Nota-se também que não foi detectada a presença do analito na amostra testemunha. Isso significa que a amostra estava isenta do composto de

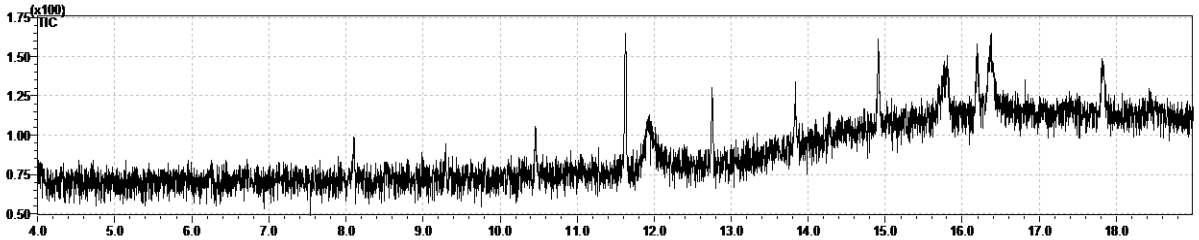
interesse ou este estava em concentração inferior ao limite de detecção do método, ou seja, o método foi considerado seletivo, pois permite detectar e quantificar o BFA nas amostras fortificadas com quantidades conhecidas do analito em estudo.

Figura 21 - Cromatograma obtido da análise da amostra testemunha



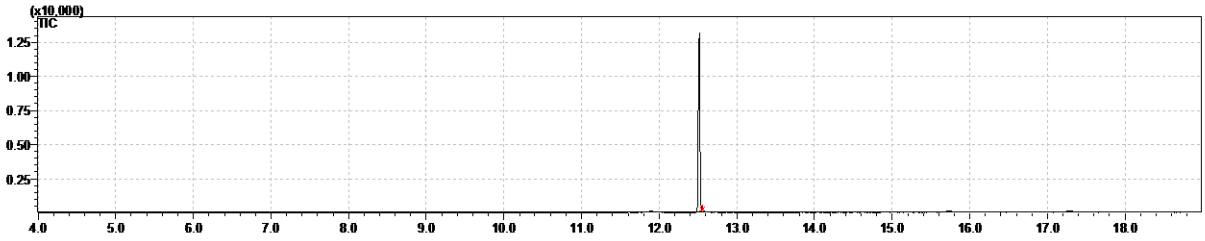
Fonte: *Print screen* da aplicação no sistema operacional do equipamento, 2013.

Figura 22 - Cromatograma obtido da análise do branco



Fonte: *Print screen* da aplicação no sistema operacional do equipamento, 2013.

Figura 23 - Cromatograma obtido da análise da amostra testemunha, fortificada com 50 ng mL^{-1} de BFA

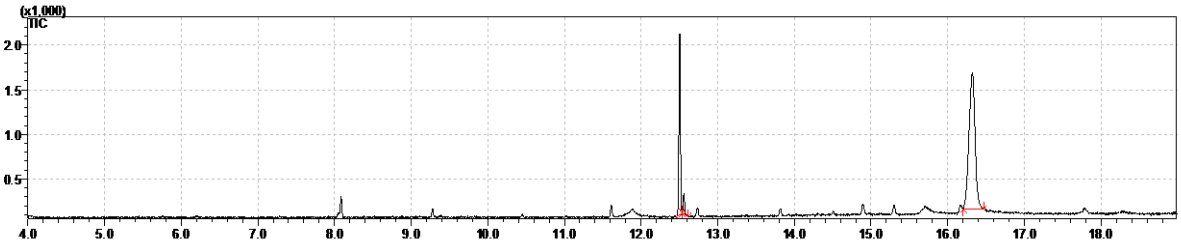


Fonte: *Print screen* da aplicação no sistema operacional do equipamento, 2013.

4.3.2 Ensaios de recuperação

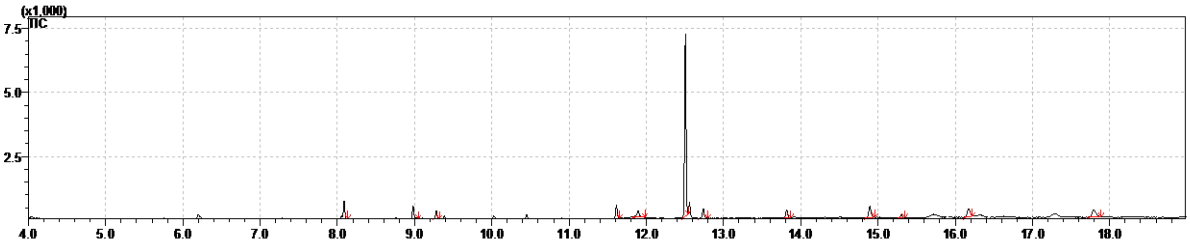
Foram efetuados ensaios de recuperação para se verificar a precisão e a exatidão do método. Para o estudo de recuperação, amostras fortificadas na concentração de 10, 30 e 50 ng mL^{-1} foram submetidas ao processo analítico, a fim de se verificar a eficiência do método de extração. Os dados referentes ao estudo preliminar das recuperações podem ser vistos na Tabela 11 e os cromatogramas nas Figuras 27, 28 e 29.

Figura 24 - Cromatograma obtido da análise da amostra de saliva, fortificada com 10 ng mL^{-1} de BFA



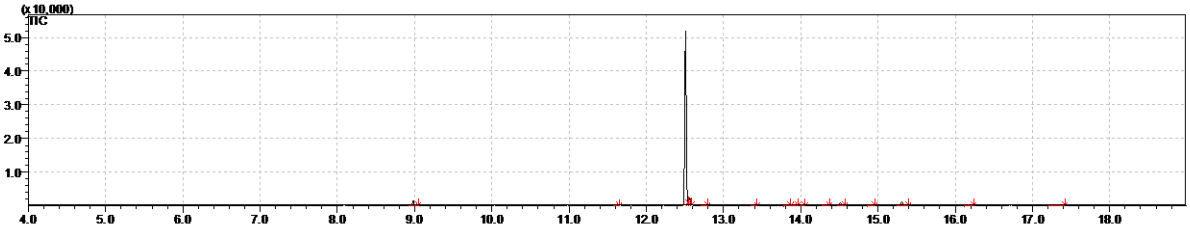
Fonte: *Print screen* da aplicação no sistema operacional do equipamento, 2013.

Figura 25 - Cromatograma obtido da análise da amostra de saliva, fortificada com 30 ng mL^{-1} de BFA



Fonte: *Print screen* da aplicação no sistema operacional do equipamento, 2013.

Figura 26 - Cromatograma obtido da análise da amostra de saliva, fortificada com 50 ng mL^{-1} de BFA



Fonte: *Print screen* da aplicação no sistema operacional do equipamento, 2013.

Tabela 11- Recuperações em amostras de saliva fortificadas com BFA

Concentrações (ng mL^{-1})[1]	Área	CV(%)[2]	Rec (%)[3]
10	2550	17	94
30	10338	12	102
50	16797	7	105

Fonte: Elaborada pelo autor, 2013.
[1]Concentração de padrão de BFA na matriz; [2]Coeficiente de variação percentual referente as três replicatas; [3]Recuperação média das cinco replicatas.

Verificou-se que o método de extração, utilizando acetonitrila como solvente na ELL e efetuando a lavagem do frasco após secagem com metanol, foi eficiente, pois as recuperações das amostras fortificadas estão dentro dos valores exigidos, sendo possível então validar o método. Esses valores obtidos de recuperação foram superiores aqueles encontrados por (JAKIMSKA et al., 2013; KOSARAC et al., 2012; CHEN et al., 2012) que também utilizaram a ELL.

4.3.3 Precisão e exatidão

A precisão foi avaliada através dos coeficientes de variação CV(%). Os valores de CV(%) variaram de 7,0 a 17,0 %. Sendo assim, o método foi considerado preciso, pois todos os valores de CV(%) estiveram abaixo do limite, recomendado pela literatura de 20% (RIBANI et al., 2004).

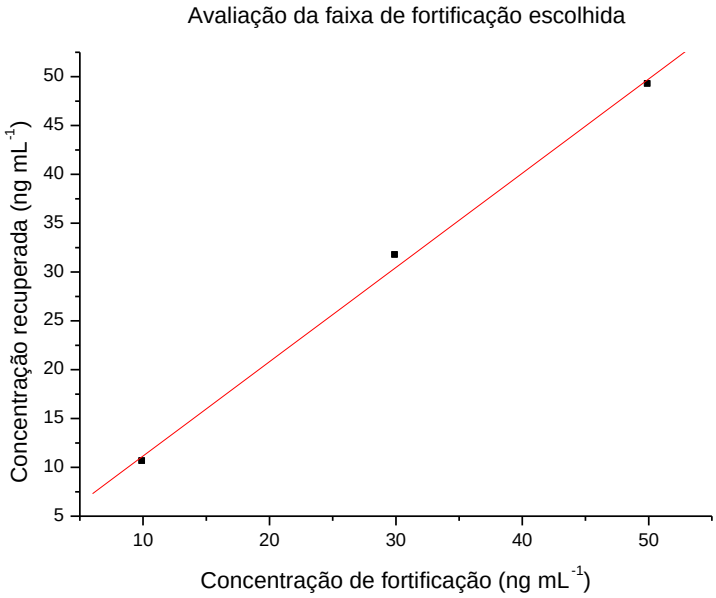
A exatidão foi avaliada pelos valores percentuais de recuperação. O método foi considerado exato, uma vez que as recuperações estiveram dentro do limites (70 a 120%), estabelecidos pela literatura na área de análise de resíduos de pesticidas (RIBANI et al., 2004).

4.3.4 Avaliação da faixa de fortificação escolhida

A faixa de fortificação escolhida para os testes de recuperação foi avaliada através da correlação entre a concentração obtida e a concentração de fortificação.

A Figura 30 apresenta o gráfico de concentração obtida versus concentração de fortificação.

Figura 27 - Linearidade da relação concentração de fortificação com a concentração recuperada



Fonte: Elaborada pelo autor, 2013.

Tabela 12 - Dados obtidos das curvas de linearidade da relação concentração de fortificação com a concentração recuperada

Composto	Curva analítica	Coeficiente de correlação (R)
BFA	y = 1,47378x – 0,03433	0,9985

Fonte: Elaborada pelo autor, 2013.

Pelo coeficiente de correlação obtido, pode-se afirmar que a relação concentração de fortificação:concentração recuperada foi suficientemente linear para assegurar a faixa utilizada nos ensaios de recuperação. Os coeficientes angular e

linear para a curva demonstram a exatidão do método nessa faixa de fortificação, visto que o coeficiente angular obtido apresentou valor próximo da unidade, e o coeficiente linear apresentou valor próximo à zero.

4.4 Análise das resinas

4.4.1 Estudo preliminar das resinas

As resinas mais utilizadas no mercado foram avaliadas, após serem polimerizadas, para identificar quais apresentam maior lixiviação durante o processo de extração. Os dados podem ser vistos na Tabela 13.

Tabela 13 - Dados obtidos das resinas que foram submetidas ao processo de extração

Resina	Massa (g)	BFA encontrado (ng g^{-1})
Opalis	0,2684	77,9
Dura Fill (Cor:A3)	0,2076	ND
Z100	0,2484	ND
Natural Look (DFL)	0,2961	91,2
AP.H	0,2516	1323,5
Charisma	0,3577	201,2
P60 (Cor C2)	0,2742	55,4
Z350XT (Cor C2)	0,2453	31,4

Fonte: Elaborada pelo autor, 2013.
ND = Não detectado

Como pode ser visto na Tabela 13, as resinas que apresentaram as maiores lixiviações, dentro da curva dos padrões, foram a Charisma, P60, Natural Look e Opalis, sendo essas as mais utilizadas pelos dentistas. Duas destas resinas foram utilizadas nos procedimentos odontológicos de acordo com a necessidade definida pela especialista. A resina AP.H apresentou valores fora da curva, pois sua polimerização pode não ter sido completa, o que ocasionou a alta lixiviação.

4.4.2 Análise das amostras de saliva

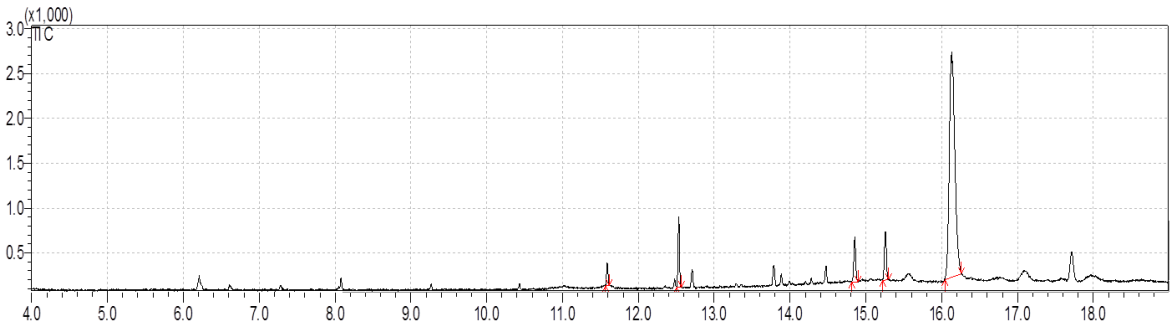
As amostras de saliva de pacientes que passaram pelo procedimento odontológico foram analisadas e os dados podem ser vistos na Tabela 14. As resinas utilizadas no tratamento dos dois pacientes foram a P60 e Opalis, conforme determinado pela dentista, sendo aplicada em apenas um dente de cada paciente. As amostras de P60 após duas horas e as amostras da resina Opalis foram concentradas a partir de 0,5 mL, pois ficaram fora do limite de quantificação. Os cromatogramas obtidos nas análises das resinas P60 e Opalis, após o tratamento odontológico, podem ser vistos nas Figuras 31 e 32.

Tabela 14 - Resultado obtido das amostras de pacientes antes e após o tratamento dentário

Resina	Tempo	Concentração ng mL^{-1}
P60	Antes	7,2
	Logo Após	72,3
	1 Hora Após	13,8
	2 Horas Após	6,3
Opalis	Antes	ND
	Logo Após	5,5
	1 Hora Após	6,0
	2 Horas Após	5,7

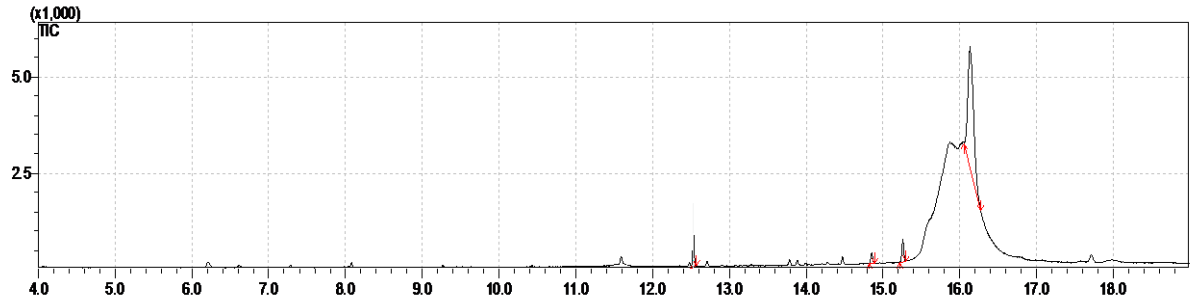
Fonte: Elaborada pelo autor, 2013.
ND = Não detectado

Figura 28 - Cromatograma obtido para a amostra da resina P60 após o tratamento odontológico



Fonte: *Print screen* da aplicação no sistema operacional do equipamento, 2013.

Figura 29 - Cromatograma obtido para a amostra da resina Opalis após o tratamento odontológico



Fonte: *Print screen* da aplicação no sistema operacional do equipamento, 2013.

Analisando os resultados obtidos das amostras identifica-se um aumento da concentração de BFA logo após o tratamento dentário e após algumas horas a concentração de BFA começa a diminuir. Isso mostra que a polimerização acaba não sendo completa ocasionando a lixiviação do BFA na saliva, o qual tende a ser absorvido via oral. Analisando os valores encontrados de BFA na Tabela 14, nota-se que estes ficaram acima da variação de 0,39 – 0,66 ng mL^{-1} encontrados por (KINGMAN, 2012) na saliva de 170 pacientes.

5 CONCLUSÃO

O presente trabalho avaliou a lixiviação de BFA nas resinas dentárias. O método desenvolvido e validado utilizou a ELL, derivação com BSTFA e detecção por CG-EM. A precisão e a exatidão foram avaliadas através de ensaios de recuperação. Recuperações variando de 94 a 105% e coeficientes de variação percentuais variando entre 7 a 17% foram obtidos com LD e LQ do método de 3,5 e 10,0 ng mL^{-1}, respectivamente.

Os resultados obtidos demonstram que o método é simples, rápido, eficiente e de baixo custo, podendo ser utilizado com confiabilidade na determinação do BFA em baixas concentrações (ppb) na saliva.

Amostras reais de saliva de pacientes que passaram pelo tratamento dentário com duas resinas foram analisadas. Identificou-se em uma delas, P60, uma concentração maior de BFA na saliva logo após o tratamento, que diminuiu após algumas horas. Em outra resina, Opalis, a concentração de BFA na saliva permaneceu praticamente constante até duas horas após a aplicação do tratamento. Os resultados indicaram que o BFA foi lixiviado das resinas e que a polimerização não é completa. Os dois tratamentos dentários foram realizados de modo similar, sendo que a resina P60 liberou uma maior concentração de BFA.

Visto que o material não polimerizado é todo solubilizado pela saliva e absorvido pelo organismo e considerando os malefícios do BFA, o presente trabalho, pelos resultados obtidos, fornece uma ótima metodologia analítica para avaliação de controle de resinas utilizadas no mercado odontológico, de modo a fornecer informações relativas à lixiviação do BFA pelas mesmas aos profissionais da área.

REFERÊNCIAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA): Resolução RDC n. 41/2011 de 16/09/2011.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA): Resolução RE nº 899 de 29/05/2003.

ASCHENGRAU, A.; COOGAN, P. F.; QUINN, M.; CASHINS, L. J. Occupational exposure to estrogenic chemicals and the occurrence of breast cancer: an exploratory analysis. **American Journal of Industrial Medicine**, Boston, v. 34, p. 6-14, Dec. 1998.

ASHBY, J.; TINWELL, H. Uterotrophic activity of bisphenol A in the immature rat. **Environmental Health Perspectives**, London, v. 106, p. 719-720, Oct. 1998.

ATKINSON, J. C.; DIAMOND, F.; EICHMILLER, F.; SELWITZ, R.; JONES, G. Stability of bisphenol A, triethylene-glycol dimethacrylate, and bisphenol A dimethacrylate in whole saliva. **Dental Materials**, Baltimore, v. 18, p. 128-135, Apr. 2002.

BALLESTEROS, O.; ZAFRA, A.; NAVALÓN, A.; VÍLCHEZ, J. L. Sensitive gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of phthalate esters, alkylphenols, bisphenol A and their chlorinated derivatives in wastewater samples. **Journal of Chromatography A**, Granada, v. 1121, p. 154-162, May 2006.

BASHEER, C.; LEE, H. K.; TAN, K. S. Endocrine disrupting alkylphenols and bisphenol A in coastal waters and supermarket seafood from Singapore. **Marine Pollut Bull**, Singapore, v. 48, p. 1145–1167, Apr. 2004.

BASHEER, C.; PARTHIBAN, A.; JAYARAMAN, A.; LEE, H. K.; VALIYAVEETTIL, S. Determination of alkylphenols and bisphenol-A. A comparative investigation of functional polymer-coated membrane microextraction and solid-phase microextraction techniques. **Journal of Chromatography A**, Singapore, v. 1087, p. 274-282, Apr. 2005.

BECKER, K.; GÖEN, T.; SEIWERT, M.; CONRAD, A.; PICK-FUß, H.; MÜLLER, J.; WITTASSEK, M.; SCHULZ, C.; KOLOSSA-GEHRING, M. GerES IV: Phthalate metabolites and bisphenol A in urine of German children. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, Berlim, v. 212, p. 685–692, Sep. 2009.

BELFROID, A.; van VELZEN, M.; van der HORST, B.; VETHAAK, D. Occurrence of bisphenol A in surface water and uptake in fish: evaluation of field measurements. **Chemosphere**, Amsterdam, v. 49, p. 97–103, Apr. 2002.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, p. 651-666, Fev. 2007.

BISPHENOL A: Information Sheet. Disponível em <http://www.bisphenol-a.org/pdf/DiscoveryandUseOctober2002.pdf>. Acesso em: 29 Jun. 2013.

BOLZ, U.; HAGENMAIER, H.; KÖRNER, W. Phenolic zenoestrogens in surface water, sediments, and sewage sludge from Baden-Württemberg, south-west Germany. **Environmental Pollution**, Tübingen, v. 115, p. 291–301, Jan. 2001.

BOLZ, U.; KÖRNER, W.; HAGENMAIER, H. Development and validation of a GC/MS method for determination of phenolic xenoestrogens in aquatic samples. **Chemosphere**, Tübingen, v. 40, p. 925–935, Jan. 2000.

BRITO, N. M.; AMARANTE JUNIOR, O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão, **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 13, p. 129-146, Jan./Dez. 2003.

BRUCKER-DAVIS, F. Effects of environmental synthetic chemicals on thyroid function. **Thyroid,** Washington, v. 8, p. 827-856, Dec. 1998.

CHEN, M.; TAO, L.; COLLINS, E. M.; AUSTIN, C.; LU, C. Simultaneous determination of multiple phthalate metabolites and bisphenol-A in human urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B,** Boston, v. 904, p. 73-80, Jul. 2012.

COLBORN, T.; DUMANOSKI, D.; MYERS, J. P. O Futuro roubado. Porto Alegre, **LPM Editores**, 354 p. 2002.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. **Community strategy for endocrine disrupters: a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife.** Communication from the commission to the council and the European parliament, Brussels, 1999.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. **On the implementation of the community strategy for endocrine disrupters - a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife**. Communication from the commission to the council and the European parliament. Brussels, 2001.

CORDEIRO, D. S. **Estudo do comportamento químico de desreguladores endócrinos utilizando o efeito SERS e processos fotoquímicos**. 2012. 90 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

CRISP, T. M.; CLEGG, E. D.; COOPER, R. L.; WOOD, W. P.; ANDERSON, D. G.; BAETCKE, K. P.; HOFFMANN, J. L.; MORROW, M. S.; RODIER, D. J.; SCHAEFFER, J. E.; TOUART, L. W.; ZEEMAN, M. G.; PATEL, Y. M. Environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis. **Environmental Health Perspectives**, Washington, v. 106, p. 11-56, Feb. 1998.

DARMANI, H.; Al-HIYASAT, A. S. The effects of BIS-GMA and TEG-DMA on female mouse fertility. **Dental Materials**, Jordan, v. 22, p. 353-358, Apr. 2006.

del OLMO, M.; GONZÁLEZ-CASADO, A.; NAVAS, N. A.; VÍLCHEZ, J. L. Determination of bisphenol A (BPA) in water by gas chromatography-mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, Granada, v. 346, p. 87-92, Feb. 1997.

del OLMO, M.; ZAFRA, A.; SUÁREZ, B.; GONZÁLEZ-CASADO, A.; TAOUFIKI, J.; VÍLCHEZ, J. L. Use of solid-phase microextraction followed by on-column silylation for determining chlorinated bisphenol A in human plasma by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, Granada, v. 817, p. 167-172, Dec. 2005.

EURACHEM WORKING GROUP. **The Fitness for Purpose of Analytical Methods, A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics**, 1998.

FELDMAN, D.; TOKES, L.; STATHIS, P. A.; MILLER, S. C.; KURZ, W.; HARVEY, D. Identification of 17β-estradiol as the estrogenic substance in *Saccharomyces cerevisiae.* **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Stanford, v. 81, p. 4722-4726, Aug. 1984.

FENT, G.; HEIN, W. J.; MOENDEL, M. J.; KUBIAK, R. Fate of ^{14}C-bisphenol A in soils. **Chemosphere**, Neustadt, v. 51, p. 735–746, Jan. 2003.

FROMME, H.; KÜCHLER, T.; OTTO, T.; PILZ, K.; MÜLLER, J.; WENZEL, A. Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. **Water Research**, Berlin, v. 36, p. 1429–1438, Jul. 2002.

GARCÍA, N. D.; GÓMEZ, A. Z.; NAVALÓN, A.; VÍLCHEZ, J. L. Analysis of bisphenol A and its chlorinated derivatives in sewage sludge samples. Comparison of the efficiency of three extraction techniques. **Journal of Chromatography A**, Granada, v. 1253, p. 1–10, Jul. 2012.

GATIDOU, G.; THOMAIDIS, N. S.; STASINAKIS, A. S.; LEKKAS, T. D. Simultaneous determination of the endocrine disrupting compounds nonylphenol, nonylphenol ethoxylates, triclosan and bisphenol A in wastewater and sewage sludge by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Athens, v. 1138, p. 32-41, Jan. 2007.

GE, J.; CONG, J.; SUN, Y.; LI, G.; ZHOU, Z.; QIAN, C.; LIU, F. Determination of Endocrine Disrupting Chemicals in Surface Water and Industrial Wastewater from. Beijing, **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 84, p. 401–405, Mar. 2010.

GHISARI, M.; BONEFELD-JORGENSEN. Impact of environmental chemicals on the thyroid hormone function in pituitary rat GH3 cells. **Molecular and Celular Endocrinology**, Aarhus,v. 244, p.31-41, Oct. 2005.

GHISELLI, G. **Avaliação da qualidade das águas destinadas ao abastecimento público na região de Campinas: Ocorrência e determinação de interferentes endócrinos (IE) e produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PFHP).** 2006. 181 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, p. 695-706, jun. 2007.

GOLOUBKOVA, T.; SPRITZER, P. M. Xenoestrogênios: o Exemplo do Bisfenol-A. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, Porto Alegre, v. 44, p. 323-330, Ago. 2000.

GONZÁLEZ, N. S.; GRANA, E. C.; CAROUA, I. T.; LORENZOA, S. M.; MAHÍA, P. L.; RODRÍGUEZ, D. P. Determination of alkylphenols and bisphenol A in seawater samples by dispersive liquid–liquid microextraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry for compliance with environmental quality standards

(Directive 2008/105/EC). **Journal of Chromatography A**, A Coruna, v. 1223, p. 1–8, Dec. 2011.

GOULD, J. C.; LEONARD, L. S.; MANESS, S. C.; WAGNER, B. L.; CONNER, K.; ZACHAREWSKI, T.; SAFE, S.; McDONNELL, D. P.; GAIDO, K. W. Bisphenol A interacts with the estrogen receptor alpha in a distinct manner from estradiol. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Durham, v. 142, p. 203-214, Mar. 1998.

GROSHART, C. P.; OKKERMAN, P. C.; PIJNENBURG, A. M. C. M. Chemical study on bisphenol a. **Rikz Report**, Waterstaat, p. 27, Jul. 2001.

GRUMETTO, L.; MONTESANO, D.; SECCIA, S.; ALBRIZIO, S.; BARBATO, F. Determination of Bisphenol A and Bisphenol B Residues in Canned Peeled Tomatoes by Reversed-Phase Liquid Chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Napoli, v. 56, p. 10633–10637, Nov. 2008.

GUYTON, A. C; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 10ª Edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A, 2002. 973 p.

HADJMOHAMMADI, M. R.; SAEIDI, I. Determination of bisphenol A in Iranian packaged milk by solid-phase extraction and HPLC. **Monatshefte für Chemie**, Babolsar, v. 141, p. 501–506, May. 2010.

HANAOKA, T.; KAWAMURA, N.; HARA, K.; TSUGANE, S. Urinary bisphenol A and plasma hormone concentrations in male workers exposed to bisphenol A diglycidyl ether and mixed organic solvents. **Occupational and Environmental Medicine**, Kashiwanoha, v. 59, p. 625–628, Mar. 2002.

HARRIS, Daniel. C. **Análise Química Quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S.A. 2005.

HARRISON, P. T.; HOLMES, P.; HUMFREY, C. D. Reproductive health in humans and wildlife: are adverse trends associated with environmental chemical exposure? **Science of the Total Environment**, Leicester, v. 205, p. 97-106, Jul. 1997.

HEEMKEN, O. P.; REINCKE, H.; STACHEL, R.; THEOBALD, N. The occurrence of xenoestrogens in the Elbe River and the North Sea. **Chemosphere**, Hamburg, v. 45, p. 245–259, Nov. 2001.

HENDRIKS, A. J.; MAAS-DIEPEVEEN, J. L.; NOORDSIJ, A. Van der GAAG, M. A. Monitoring response of XAD-concentrated water in the Rhine delta: a major part of the toxic compounds remains unidentified. **Water Research**, Lelystad, v. 28, p. 581–598, Apr. 1994.

HSU, W. Y. WANG, V. S. LAI, C. C. TSAI, F. J. Simultaneous determination of components released from dental composite resins in human saliva by liquid chromatography/multiple-stage ion trap mass spectrometry. **Journal of Electrophoresis**, Taiwan, v. 33, p. 719-725, Nov. 2011.

HUANG, Y. Q.; WONG, C. K. C.; ZHENG J. S.; BOUWMAN, H.; BARRA, R.; WAHLSTRÖM, B.; NERETIN, L.; WONG, M. H. Bisphenol A (BPA) in China: A review of sources, environmental levels, and potential human health impacts. **Environment International**, Hong Kong, v. 42, p. 91-99, May. 2012.

IKE, M.; JIN, C. S.; FUJITA, M. Biodegradation of bisphenol A in the aquatic environment. **Water Science and Technology**, Osaka, v. 42, p. 31–38, Jan. 2000.

INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA). DOQ-CGCRE-008, **Orientações Sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos, Revisão:** 01 – Março/2003.

INOUE, K.; KATO, K.; YOSHIMURA, Y.; MAKINO, T.; NAKAZAWA, H. Determination of bisphenol A in human serum by high-performance liquid chromatography with multi-electrode electrochemical detection. **Journal of Chromatography B**, Tokyo, v. 749, p. 17-23, Nov. 2000.

INOUE, K.; YAMAGUCHI, A.; WADA, M.; YOSHIMURA, Y.; MAKINO, T.; NAKAZAWA, H. Quantitative detection of bisphenol A and bisphenol A diglycidyl ether metabolites in human plasma by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, Tokyo, v. 765, p. 121-126, Dec. 2001.

INOUE, K.; YOSHIE, Y.; KONDO, S.; YOSHIMURA, Y.; NAKAZAWA, H. Determination of phenolic xenoestrogens in water by liquid chromatography with coulometric-array detection. **Journal of Chromatography A**, Tokyo, v. 946, p. 291-294, Nov. 2002a.

INOUE, K.; WADA, M.; HIGUCHI, T.; OSHIO, S.; UMEDA, T.; YOSHIMURA, Y.; NAKAZAWA, H. Application of liquid chromatography–mass spectrometry to the quantification of bisphenol A in human semen. **Journal of Chromatography B**, Tokyo, v. 773, p. 97-102, Fev. 2002b.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA (INMETRO). **DOQ-CGCRE-008,** Orientações Sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos, Revisão: 01 – Março/2003.

ISO/IEC 17025 – International Standard Organization, **General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories**. 1999.

JAKIMSKA, A.; HUERTA, B.; BARGANSKA, Z.; WASIK, A. K.; MOZAZ, S. R.; BARCELÓ, D. Development of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry procedure for determination of endocrine disrupting compounds infish from Mediterranean rivers. **Journal of Chromatography A**, Gdansk, v. *in press*, Jul. 2013.

JENSEN, T. K.; TOPPARI, J.; KEIDING, N.; SKAKKEBAEK, N. E. Do environmental estrogens contribute to the decline in male reproductive health? **Clinical Chemistry**, Copenhagen, v. 41, p. 1896-1901, Sep. 1995.

JIN, X.; JIANG, G.; HUANG, G.; LIU, J.; ZHOU, Q. Determination of 4-tert-octylphenol, 4-nonylphenol and bisphenol A in surface waters from the Haihe River in Tianjin by gas chromatography–mass spectrometry with selected ion monitoring. **Chemosphere**, Tianjin, v. 56, p. 1113-1119, Apr. 2004.

JOSKOW, R. D. B.; BARR. Exposure to Bisphenol A (BPA) from Dental Sealants is Detectable in Saliva and Urine, and Varies Significantly Between Sealant Formulations **The Journal of the American Dental Association**, Washington, V. 7, p. 79–80, Jun. 2007.

KANG, J. H.; KONDO, F. Bisphenol A degradation by bacteria isolated from river water. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, Gakuen, v. 43, p. 265–269, Mar. 2002a.

KANG, J. H.; KONDO, F. Bisphenol A degradation in river water is different from that in seawater. **Chemosphere**, Fukuoka, v. 60, p. 1288–1292, Mar. 2005.

KANG, J. H.; KONDO, F. Effects of bacterial counts and temperature on the biodegradation of bisphenol A in river water. **Chemosphere**, Gakuen, v. 49, p. 493–498, Jun. 2002b.

KANG, J. H.; KONDO, F.; KATAYAMA, Y. Human exposure to bisphenol A. **Toxicology**, Fukuoka, v. 226, p. 79-89, Jun. 2006.

KAWAGUCHI, M.; ITO, R.; ENDO, N.; OKANOUCHI, N.; SAKUI, N.; SAITO, K.; NAKAZAWA, K. Liquid phase microextraction with in situ derivatization for measurement of bisphenol A in river water sample by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Tokyo, v. 1110, p. 1-5, Feb. 2006.

KAWAGUCHI, M.; SAKUI, N.; OKANOUCHI, N.; ITO, R.; SAITO, K.; IZUMI, S. I.; MAKINO, T.; NAKAZAWA, H. Stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption-gas chromatography–mass spectrometry for measurement of phenolic xenoestrogens in human urine samples. **Journal of Chromatography B**, Tokyo, v. 820, p. 49-57, Apr. 2005.

KAWAHATA, H.; OHTA, H.; INOUE, M.; SUZUKI, A. Endocrine disrupter nonylphenol and bisphenol A contamination in Okinawa and Ishigaki islands. Japan-within coral reefs and adjacent river mouths. **Chemosphere**, Ibaraki, v. 55, p. 1519–1527, Jan. 2004.

KINGMAN, A.; HYMAN, J.; MASTEN, S. A.; JAYARAM, B.; SMITH, C.; EICHMILLER, F.; ARNOLD, M. C.; WONG, P. A.; SCHAEFFER, J. M.; SOLANKI, S.; DUNN, W. J. Bisphenol A and other compounds in human saliva and urine associated with the placement of composite restorations**. The Journal of the American Dental Association**, Bethesda, v. 143(12), p. 1292-302, Dec. 2012.

KLEËCKA, G. M.; GONSIOR, S. J.; WEST, R. J.; GOODWIN, P. A.; MARKHAM, D. A. Biodegradation of bisphenol A in aquatic environments: river die-away. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Michigan, v. 20, p. 2725–2735, Dec. 2001.

KOMATSU, E.; VAZ, J. M. Otimização dos parâmetros de extração para determinação multiresíduo de pesticidas em amostras de água empregando microextração em fase sólida. **Química Nova**, São Paulo**,** v. 27, n. 5, p. 720-724, Oct. 2004.

KOSARAC, I.; KUBWABO, C.; LALONDE, K.; FOSTER, W. A novel method for the quantitative determination of free and conjugated bisphenol A in human maternal and umbilical cord blood serum using a two-step solid phase extraction and gas chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, Brigthon, v. 898, p. 90-94, Apr. 2012.

KRISHNAN, A.V.; STATHIS, P.; PERMUTH, S. F.; TOKES, L.; FELDMAN, D. Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. **Endocrinology**, Stanford, v. 132, p. 2279-2286, Sep. 1993.

KROTZ, S. P.; CARSON, S. A.; TOMEY, C.; BUSTER, J. E. Phthalates and bisphenol do not accumulate in human follicular fluid. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics,** Houston, v. 29, p. 773-777, Apr. 2012.

KUIPER, G. G.; LEMMEN, J. G.; CARLSSON, B.; CORTON, J. C.; SAFE, S. H.; van der SAAG, P. T.; van der BURG, B.; GUSTAFSSON, J. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. **Endocrinology**, Huddinge, v. 139, p. 4252-4263, Jan. 1998.

KURODA, N.; KINOSHITA, Y.; SUN, Y.; WADA, M.; KISHIKAWA, N.; NAKASHIMA, K.; MAKINO, T.; NAKAZAWA, H. Measurement of bisphenol A levels in human blood serum and ascitic fluid by HPLC using a fluorescent labeling reagent. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Nagasaki, v. 30, p. 1743-1749, Jan. 2003.

LARSSON, D. G. J.; ADOLFSSON-ERICI, M.; PARKKONEN, J.; PETTERSSON, M.; BERG, A. H.; OLSSON, P. E.; FÖRLIN, L. Ethinyloestradiol - an undesired fish contraceptive? **Aquatic Toxicology**, Göteborg, v. 45, p. 91–97, Sep. 1999.

LEATHARD, D. A.; SHURLOCK, B. C. **Identification techniques in gas chromatography**. John Wiley & Sons, Inc. Nova Iork. 1970.

LINTELMANN, J.; KATAYAMA, A.; KURIHARA, N.; SHORE, L.; WENZEL, A. Endocrine disruptors in the environment. **Pure and Applied Chemistry**, Neuherberg, v.75, p. 631-681, Jan. 2003.

LIU, R.; ZHOU, J. L.; WILDING, A. Simultaneous determination of endocrine disrupting phenolic compounds and steroids in water by solid-phase extraction–gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, Brigthon, v. 1022, p. 179-189, Sep. 2004.

LIU, S.; XIE, Q.; CHEN, J.; SUN, J.; HE, H.; ZANG, X. Development and comparison of two dispersive liquid-liquid microextraction techniques coupled to high performance liquid chromatography for the rapid analysis of bisphenol A in edible oils. **Journal of Chromatography A**, Yangling, V. *in press.* Apr, 2013.

LÓPEZ-DARIAS, J.; GERMÁN-HERNÁNDEZ, M.; PINO, V.; AFONSO, A. M. Dispersive liquid–liquid microextraction versus single-drop microextraction for the determination of several endocrine-disrupting phenols from seawaters. **Talanta**, v. 80, p. 1611–1618, Oct. 2009.

LU, J.; WU, J.; STOFFELLA, P. J.; WILSON, P. C. Isotope dilution-gas chromatography/mass spectrometry method for the analysis of alkylphenols, bisphenol A, and estrogens in food crops. **Journal of Chromatography A**, Fort Pierce, v. 1258, p. 128– 135, Aug. 2012

LUTZ, I.; KLOAS, W. Amphibians as a model to study endocrine disruptors: Environmental pollution and estrogens receptor binding. **The Science of the Total Environmental**, Karlsruhe, v. 225, p. 49-57, Jan. 1999.

MARAGOU, N. C.; LAMPI, E. N.; THOMAIDIS, N. S.; KOUPPARIS, M. A. Determination of bisphenol A in milk by solid phase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Athens, v. 1129, p. 165-173, Oct. 2006.

MATSUMOTO, G. Comparative study on organic constituents in polluted and unpolluted inland aquatic environments. **Water Research**, Tokyo, v. 16, p. 551–557, Apr. 1982.

MENDHAM, J.; DENNEY, R. C.; BARNES, J. D.; THOMAS, M. J. K. **Vogel: Análise Química Quantitativa.** 6ª ed. LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S.A. 2002.

MENEGAZZO, L. M. **Estudo do grau de conversão e dureza em compósitos odontológicos fotopolimerizáveis**. 2007. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Materiais) – Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2007.

MILLIGAN, S. R.; BALASUBRAMANIAN, A. V. Relative potency of xenobiotic estrogens in an acute *in vivo* mammalian assay. **Environmental Health Perspectives**, London, v. 106, p. 23-26, Sep. 1998.

MORALES, T. V.; FERRERA, Z. S.; RODRÍGUEZ, J. J. Development and optimisation of an on-line solid phase extraction coupled to ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry methodology for the simultaneous determination of endocrine disrupting compounds in wastewater samples. **Journal of Chromatography A**, Las Palmas de Gran Canaria, v. 1230, p. 66– 76, Feb. 2012

NAKAMURA, S.; DAISHIMA, S. Simultaneous determination of alkylphenols and bisphenol A in river water by stir bar sorptive extraction with in situ acetylation and thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Tokyo, v. 1038, p. 291-294, Apr. 2004.

NAM, S. H.; SEO, Y. M.; KIM, M. G. Bisphenol A migration from polycarbonate baby bottle with repeated use. **Chemosphere**, Hyoja-dong, v. 79, p. 949–952, May. 2010.

NATHANSON, D.; LERTPITAYAKUN, P.; LAMKIN, M. S.; EDALATPOUR, M.; CHOU, L. L. In vitro elution of leachable components from dental sealants. **The Journal of the American Dental Association**, New York, v. 128, p. 1517-1523, Nov. 1997.

OCA, M. L.; ORTIZ, M. C.; HERRERO, A.; SARABIA, L. A. Optimization of a GC/MS procedure that uses parallel factor analysis for the determination of bisphenols and their diglycidyl ethers after migration from polycarbonate tableware. **Talanta**, Burgos, v. 106, p. 266-280, Nov. 2013.

OLEA, N.; PULGAR, R.; PÊREZ, P.; OLEA-SERRANO, F.; RIVAS, A.; NOVILLO-FERTRELL, A.; PEDRAZA, V.; SOTO, A. M.; SONNENSCHEIN, C. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. **Environmental Health Perspectives**, Granada, v. 104, p. 298-305, Nov. 1996.

OUCHI, K.; WATANABE, S. Measurement of bisphenol A in human urine using liquid chromatography with multi-channel coulometric electrochemical detection. **Journal of Chromatography B**, Tokyo, v. 780, p. 365-370, Nov. 2002.

PETROVIC, M.; ELJARRAT, E.; LOPEZ DE ALDA, M. J.; BARCELÓ, D. Analysis and environmental levels of endocrine-disrupting compounds in freshwater sediments. **Trends in Analytical Chemistry**, Barcelona, v. 20, p. 637-648. Nov. 2001.

PORRINI, S.; BELLONI, V.; SETA, D. D.; FARABOLLINI, F.; GIANNELLI, G.; DESSÌ-FULGHERI, F. Early exposure to a low dose of bisphenol A affects socio-sexual behavior of juvenile female rats. **Brain Research Bulletin**, Florença, v. 65, p. 261-266, Dec. 2005.

RAZZOLI, M.; VALSECCHI, P.; PALANZA, P. Chronic exposure to low doses bisphenol A interferes with pair-bonding and exploration in female Mongolian gerbils. **Brain Research Bulletin**, Parma, v. 65, p. 249-254, Dec. 2005.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C.Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, p. 771-780, jun. 2004.

RIDGWAY, K.; LALLJIE, S. P. D.; SMITH, R. M. Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. **Journal of Chromatography A**, Bedfordshire, v. 1153, N. 1-2, p. 36-53, Feb. 2007.

ROCHA, R.S.F. **Estudo de propriedades físico-químicas de resinas odontológicas: grau de conversão, dureza e expansão térmica. 2006. 72 f.** Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais). Faculdade de Engenharia da UNESP, Ilha Solteira, 2006.

RODRIGUEZ-MOZAZ, S. M. J. L.; BARCELÓ, D. Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction–liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Barcelona, v. 1045, p. 85-92, Jun. 2004.

ROY, D.; COLERANGLE, J. B.; SINGH, K. P. Is exposure to environmental or industrial endocrine disrupting estrogen-like chemicals able to cause genomic instability? **Frontiers in Bioscience**, Alabama, v. 3: p. 913-921, Jul. 1998.

RUDEL, R. A.; BRODY, J. G.; SPENGLER, J. D.; VALLARINO, J.; GENO, P. W.; SUN, G.; YAU, A. Identification of selected hormonally active agents and animal mammary carcinogens in commercial and residential air and dust samples. **Journal of the Air & Waste Management Association**, Newton, v. 51, p. 499–513, Apr. 2001.

SAJIKI, J.; TAKAHASHI, K.; YONEKUBO, J. Sensitive method for the determination of bisphenol-A in serum using two systems of high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, Chiba, v. 736, p. 255-261, Dec. 1999.

SAUNDERS, P. T.; MAJDIC, G.; PARTE, P.; MILLAR, M. R.; FISHER, J. S.; TURNER, K. J.; SHARPE, R. M. Fetal and perinatal influence of xenoestrogens on testis gene expression. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, Edinburgh,v. 424, p. 99-110, Dec. 1997.

SCHWARTZ-MITTELMAN, A.; BARUCH, A.; NEUFELD, T.; BUCHNER, V.; RISHPON, J. Electrochemical detection of xenoestrogenic and antiestrogenic compounds using a yeast two-hybrid-17-β-estradiol system. **Bioelectrochemistry**, Tel-aviv, v. 65, p. 149-156, Dec. 2005.

SETA, D. D.; MINDER, I.; DESSÌ-FULGHERI, F.; FARABOLLINI, F. Bisphenol A exposure during pregnancy and lactation affects maternal behavior in rats**. Brain Research Bulletin**, Siena, v. 65, p. 255-260, Dec. 2005.

SÖDERHOLM, K. J.; PHIL, M.; MARIOTTI, A. Bis-GMA - Based resins in dentistry: are they safe? **The Journal of the American Dental Association**, New York, v. 130, p. 201-209, Feb. 1999.

SONNENSCHEIN, C.; SOTO, A. M. An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, Boston, v. 65, p.143-150, May, 1998.

SOTO, A. M. SONNENSCHEIN, C. CHUNG, K. L. FERNANDEZ, M. F. OLEA, N.; SERRANO F. O. The E-SCREEN Assay as a Tool to Identify Estrogens: An Update on Estrogenic Environmental Pollutants. **Environmental Health Perspectives**, Boston, v. 103, p. 113-122, Oct. 1995.

STAPLES, C. A.; DORN, P. B.; KLECKA, G. M.; O'BLOCK, S. T.; HARRIS, L. R. A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. **Chemosphere**, Fairfax, v. 36, p. 2149–2173, Oct. 1998.

STAPLES, C. A.; WILLIAMS, J. B.; BLESSING, R. L.; VARINEAU, P. T. Measuring the biodegradability of nonylphenol ether carboxylates, octylphenol ether carboxylates, and nonylphenol. **Chemosphere**, Fairfax, v. 38, p. 2029–2039, Jul. 1999.

SUNGUR, S.; KOROGLU, M.; OZKAN, A. Determınatıon of Bısphenol a Mıgratıng from Canned Food and Beverages ın Markets. **Food Chemistry**, Hatay, v. *in press*, Jul. 2013.

TOPPARI, J.; LARSEN, J. C.; CHRISTIANSEN, P.; GIWERCMAN, A.; GRANDJEAN, P.; GUILLETTE, L. J.; JÉGOU, B.; JENSEN, T. K.; JOUANNET, P.; KEIDING, N.; LEFFERS, H.; McLACHLAN, J. A;. MEYER, O.; MÜLLER, J.; MEYTS, E. R.; SCHEIKE, T.; SHARPE, R.; SUMPTER, J.; SKAKKEBÆK, N. E. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. **Environmental Health Perspectives**, Copenhagen, v. 104, p. 741-776, Mar. 1996.

TOUCHSTONE, J. C. **Pratice of thin layer chromatography**. 3ª ed. John Wiley & Sons, Inc. Nova Iork. 1992.

TOXIPEDIA – Bisfenol A. Disponível em: <http://toxipedia.org/display/toxipedia/Bisphenol-A>. Acesso em: 29 Jun. 2013

TSUTSUMI, O. Assessment of human contaminants of estrogen endocrine-disrupting chemicals and theirs risk for human reproduction. **Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 93, p. 325-330, 2005.

UPS - United States Pharmacopeia Convention; *US Pharmacopeia 24,* Validation of Compendial Methods <1225>*,* Rockville, 1999.

VÍLCHEZ, J. L.; ZAFRA, A.; GONZÁLEZ-CASADO, A.; HONTORIA, E.; del OLMO, M. Determination of trace amounts of bisphenol F, bisphenol A and their diglycidyl ethers in wastewater by gas chromatography–mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, Granada, v. 431, p. 31-40, Nov. 2001.

VIÑAS, P.; CAMPILLO, N.; MARTÍNEZ-CASTILLO, N.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Comparison of two derivatization-based methods for solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometric determination of bisphenol A, bisphenol S and biphenol migrated from food cans. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Murcia, v. 397, p. 115–125, May. 2010.

WHO - World Health Organization Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations; *Thirty-second report*, WHO **Technical Report Series**, n. 823, Geneva, 1992.

YANG, S. H.; MORGAN, A. A.; NGUYEN, H. P.; MOORE, H.; FIGARD, B. J.; SCHUG, K. A. Quantitative determination of bisphenol a from human saliva using bulk derivatization and trap-and-elute liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Arlington, v. 30, p. 1243–1251, Jan. 2011.

YING, G. G.; KOOKANA, R. S. Degradation of five selected endocrine-disrupting chemicals in seawater and marine sediment. **Environmental Science & Technology**, Adelaide, v. 37, p. 1256–1260, Jan. 2003.

YOON, Y.; WESTERHOFF, P.; SNYDER, S. A.; ESPARZA, M. HPLC-fluorescence detection and adsorption of bisphenol A, 17*β*-estradiol, and 17*α*-ethynyl estradiol on powdered activated carbon. **Water Research**, Tempe, v. 37, p. 3530-3537, Apr. 2003.

YOSHIMURA, Y.; BROCK, J. W.; MAKINO, T.; NAKAZAWA, H. Measurement of bisphenol A in human serum by gas chromatography/mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, Tokyo, v. 458, p. 331-336, Jan. 2002.

ZAFRA, A.; del OLMO, M.; PULGAR, R.; NAVALÓN A. VÍLCHEZ, J. L. Determination of BisphenoI-A and Related Compounds in Human Saliva by Gas Chromatography - Mass Spectrometry. **Chromatographia**, Granada, v. 56, p. 213-218, Aug. 2002.

ZAFRA, A.; del OLMO, M.; SUÁREZ, HONTORIA, E.; NAVALÓN, A.; VÍLCHEZ, J. L. Gas chromatographic–mass spectrometric method for the determination of bisphenol A and its chlorinated derivatives in urban wastewater. **Water Research**, Granada, v. 37, p. 735-742, Aug. 2003.

ZHANG, J. M.; COOKE, G.; CURRAN, I. H. A.; GOODYER, C. G.; CAO, X. GC–MS analysis of bisphenol A in human placental and fetal liver samples. **Journal of Chromatography B**, Health, v. 879, p. 209-214, Dec. 2010.

ZOELLER, R. T. Environmental chemicals as thyroid hormone analogues: new studies indicate that thyroid hormone receptors are targets of industrial chemicals? **Molecular and Celular Endocrinology**, Amherst, v. 242, p-10-15, Oct. 2005.