



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**



**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**  
**MESTRADO EM QUÍMICA**

**ALECSANDRA LEITE PEREIRA**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA DE ANÁLISE DE**  
**BISFENOL A EM AMOSTRAS DE ÁGUA**  
**MINERAL POR CG-DCE**

Campo Grande/MS  
**2009**



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**



**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**  
**MESTRADO EM QUÍMICA**

**ALECSANDRA LEITE PEREIRA**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA DE ANÁLISE DE**  
**BISFENOL A EM AMOSTRAS DE ÁGUA**  
**MINERAL POR CG-DCE**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, na área de concentração em Físico-Química.

*ORIENTADORA:* Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marcia Helena de Rizzo da Matta

Campo Grande/MS  
2009



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



## TERMO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

DE

ALECSANDRA LEITE PEREIRA

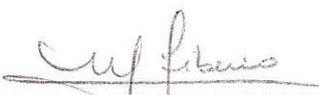
“DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA DE ANÁLISE DE BISFENOL A EM AMOSTRAS DE ÁGUA MINERAL POR CG-DCE”,

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Examinadora designada pelo Colegiado do Curso de Pós-Graduação – Nível de Mestrado em Química (Resolução nº 49/2009) da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Química – Área de Concentração: Físico-Química.

Aprovada Por:

  
\_\_\_\_\_  
Profª. Drª. Márcia Helena de Rizzo da Matta  
Orientadora e Presidente da Comissão Examinadora  
DQI/UFMS

  
\_\_\_\_\_  
Profª. Drª. Maria Lúcia Ribeiro  
UNESP-Araraquara

  
\_\_\_\_\_  
Profª. Drª. Maria Lúcia Ribeiro  
DHT/UFMS

Campo Grande, 17 de dezembro de 2009.

Ao meu pai Walter, minha mãe Cecília,  
meus irmãos e amigos pelo apoio, carinho e afeto.

## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Marcia Helena de Rizzo da Matta, pelo carinho, amizade, paciência e acima de tudo por ter me orientado e dividido seus conhecimentos para realização dessa dissertação.

Aos meus pais, Walter e Cecília, pelo apoio incondicional, carinho, dedicação, incentivo e auxílio.

Aos meus irmãos, Tati e Júnior, pela disponibilidade, amizade e suporte.

Aos meus colegas e amigos do departamento, pela troca de conhecimento, auxílio e amizade, em especial a Émerson Montagner, Guilherme Fortunato e João Batista Gomes de Souza.

À Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Maria Lúcia Ribeiro por ter gentilmente cedido os aparelhos para que fosse possível a conclusão desse trabalho.

Ao Luiz Leonardo, pela atenção desprendida e auxílio no equipamento.

Aos professores do Departamento de Química, que sempre estiveram dispostos a auxiliar e dividir seus conhecimentos e sem os quais seria impossível o meu caminhar na área científica.

À CAPES pelo apoio financeiro.

À todos,

Muito obrigada!

A felicidade só é válida quando compartilhada.  
*Super Tramp*

## SUMÁRIO

|  |      |
|--|------|
| SUMÁRIO.....                               | vi   |
| RESUMO.....                                | ix   |
| ABSTRACT .....                             | x    |
| LISTA DE FIGURAS .....                     | xi   |
| LISTA DE TABELAS.....                      | xiii |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....       | xiv  |
| LISTA DE SÍMBOLOS .....                    | xvi  |
| 1 INTRODUÇÃO.....                          | 1    |
| 1.1 APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO .....      | 1    |
| 2 OBJETIVOS.....                           | 3    |
| 2.1 OBJETIVO GERAL.....                    | 3    |
| 2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....               | 3    |
| 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....              | 4    |
| 3.1 SISTEMA ENDÓCRINO.....                 | 4    |
| 3.1.1 MECANISMO DE AÇÃO DOS HORMÔNIOS..... | 4    |
| 3.2 DESREGULADORES ENDÓCRINOS (DE).....    | 6    |
| 3.3 BISFENOL A (BFA).....                  | 8    |
| 3.3.1 BFA NO MEIO AMBIENTE.....            | 10   |
| 3.3.2 EFEITOS À SAÚDE HUMANA E ANIMAL..... | 12   |
| 3.4 ÁGUA MINERAL E BFA .....               | 13   |
| 3.4.1 EMBALAGENS PARA ÁGUA MINERAL .....   | 14   |
| 3.4.1.1 POLIETILENO TEREFALATO (PET) ..... | 15   |
| 3.4.1.2 POLICLORETO DE VINILA (PVC) .....  | 16   |
| 3.4.1.3 POLIPROPILENO (PP) .....           | 17   |
| 3.4.1.4 VIDRO.....                         | 18   |

|   |    |
|---|----|
| 3.5 TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA O BFA .....                        | 18 |
| 3.6 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA .....                    | 20 |
| 3.6.1 PARÂMETROS ANALÍTICOS PARA VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ..... | 21 |
| 3.6.1.1 SELETIVIDADE.....                                       | 21 |
| 3.6.1.2 LINEARIDADE .....                                       | 22 |
| 3.6.1.3 FAIXA LINEAR DE TRABALHO .....                          | 22 |
| 3.6.1.4 SENSIBILIDADE .....                                     | 23 |
| 3.6.1.5 PRECISÃO.....   | 23 |
| 3.6.1.6 EXATIDÃO.....   | 24 |
| 3.6.1.7 LIMITE DE DETECÇÃO (LD) .....                           | 26 |
| 3.6.1.8 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ) .....                      | 27 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS.....                                      | 28 |
| 4.1 MATERIAIS .....   | 28 |
| 4.1.1 PADRÕES, REAGENTES E SOLUÇÕES.....                        | 28 |
| 4.1.1.1 SOLUÇÕES PADRÃO DE BFA .....                            | 28 |
| 4.1.1.2 SOLUÇÃO DE ÁGUA/METANOL.....                            | 28 |
| 4.1.1.3 DEMAIS REAGENTES.....                                   | 28 |
| 4.2 LIMPEZA DE VIDRARIA .....                                   | 28 |
| 4.3 METODOLOGIA ANALÍTICA .....                                 | 29 |
| 4.3.1 EXTRAÇÃO E DERIVAÇÃO .....                                | 29 |
| 4.3.2 BRANCO E TESTEMUNHA.....                                  | 31 |
| 4.3.3 AMOSTRAS DE ÁGUA MINERAL .....                            | 31 |
| 4.4 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....                              | 32 |
| 4.5 LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO .....          | 32 |
| 4.6 CURVA ANALÍTICA PARA O BFA DERIVADO COM TFAA.....           | 33 |
| 4.7 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA.....                               | 33 |
| 4.8 LINEARIDADE E FAIXA LINEAR DE TRABALHO.....                 | 33 |
| 4.9 ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO.....                                 | 33 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....                                 | 35 |

|  |    |
|--|----|
| 5.1 LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO.....      | 35 |
| 5.2 CURVA ANALÍTICA PARA O BFA DERIVADO COM TFAA.....      | 35 |
| 5.2.1 EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO.....     | 38 |
| 5.3 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA.....                          | 39 |
| 5.3.1 SELETIVIDADE.....                                    | 39 |
| 5.3.2 LINEARIDADE E FAIXA LINEAR DE TRABALHO.....          | 41 |
| 5.3.3 ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO.....                          | 41 |
| 5.3.4 EXATIDÃO.....  | 45 |
| 5.3.5 PRECISÃO.....  | 45 |
| 5.3.6 APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS DE ÁGUA MINERAL..... | 45 |
| 6 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES.....                          | 51 |
| REFERÊNCIAS.....   | 53 |

## RESUMO

O Bisfenol A (BFA) é uma substância química usada na produção de plásticos policarbonatos e resinas epóxi. O plástico policarbonato tem várias aplicações: acondicionamento de determinados alimentos e bebidas, como a água, por exemplo; fabricação de discos compactos, equipamentos de segurança e dispositivos médicos. Cerca de 90% dos estudos independentes relacionados ao BFA têm encontrado evidências de efeitos adversos para a saúde humana. O presente trabalho avalia metodologia para determinação de BFA em água mineral utilizando Extração em Fase Sólida (EFS), derivação com anidrido trifluoracético (TFAA) e análise por Cromatografia a Gás com Detector de Captura de Elétrons (CG/DCE). A curva analítica foi linear com um coeficiente de correlação ( $R$ )  $> 0,99$ , numa faixa de 25 a 250 ng mL<sup>-1</sup>. As médias das recuperações de BFA obtidas em amostras fortificadas com 25; 75 e 125 ng foram 88; 79 e 106% respectivamente. O tempo de retenção do BFA derivado com TFAA foi de 12,9 min e os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para essas amostras foram de 7,5 e 25,0 ng mL<sup>-1</sup>, respectivamente. O método foi aplicado em quatro amostras de diferentes marcas de água mineral, dentre elas apenas uma (amostra 3) apresentou resultado quantizável, 0,46 ng mL<sup>-1</sup>. Os resultados obtidos garantem que o BFA pode ser facilmente detectado e quantificado, em amostras de água mineral, usando o método proposto, que se mostrou seletivo, exato e preciso.

**Palavras-chave:** Bisfenol A, Água mineral, CG-DCE

## ABSTRACT

Bisphenol A (BPA) is chemical substance used in the production of polycarbonate plastic and epoxy resins. The polycarbonate plastic has some applications: preservation of determined foods and drinks, as water, for example; manufacture of compact records, security equipment and medical devices. About 90% of the related independent studies to the BPA have found evidences of adverse effect for the health human being. The present work evaluates the methodology for determination of BPA in mineral water using Solid Phase Extraction (SPE), derivatization with trifluoroacetic anhydride (TFAA) and analysis by Gas Chromatography with Electrons Capture Detector (GC/ECD). The calibration of the analytical curve was linear with a coefficient of correlation ( $R$ )  $> 0.99$ , starting in a band from 25 to 250  $\text{ng mL}^{-1}$ . The averages of the recoveries of BFA gotten in samples spiked with 25, 75 and 125  $\text{ng}$  had been 88, 79 and 106% respectively. The retention time of BFA derived with TFAA was of 12.9 min and the limits of detection (LD) and quantification (LQ) for these samples had been of 2.5 and 25.0  $\text{ng mL}^{-1}$ , respectively. The method was applied to four samples of different brands of mineral water, among which only one (sample 3) showed detectable result, 0.46  $\text{ng mL}^{-1}$ . The results obtained suggested that BPA could be easily detected and quantified in natural waters samples, by using the proposed method that was selective, accurate and precise.

**Keywords:** Bisphenol A, Mineral Water, GC-ECD

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> Fórmula estrutural do BFA. ....   | 8  |
| <b>Figura 2.</b> Reação de derivação do BFA com TFAA. ....   | 29 |
| <b>Figura 3.</b> Cromatograma obtido pela injeção de 1,0 µL de uma solução de BFA (25 ng mL <sup>-1</sup> ) derivado com TFAA. ....                | 35 |
| <b>Figura 4.</b> Cromatograma obtido pela injeção de 1,0 µL de uma solução de BFA (75 ng mL <sup>-1</sup> ) derivado com TFAA. ....                | 36 |
| <b>Figura 5.</b> Cromatograma obtido pela injeção de 1,0 µL de uma solução de BFA (125 ng mL <sup>-1</sup> ) derivado com TFAA. ....               | 36 |
| <b>Figura 6.</b> Cromatograma obtido pela injeção de 1,0 µL de uma solução de BFA (175 ng mL <sup>-1</sup> ) derivado com TFAA. ....               | 37 |
| <b>Figura 7.</b> Cromatograma obtido pela injeção de 1,0 µL de uma solução de BFA (250 ng mL <sup>-1</sup> ) derivado com TFAA. ....               | 37 |
| <b>Figura 8.</b> Curva analítica do BFA derivado com TFAA. ....  | 38 |
| <b>Figura 9.</b> Cromatograma obtido pela injeção de 1,0 µL do branco. ....  | 39 |
| <b>Figura 10.</b> Cromatograma ampliado obtido pela injeção de 1,0 µL do branco. ....  | 40 |
| <b>Figura 11.</b> Cromatograma obtido pela injeção de 1,0 µL da amostra testemunha. ....   | 40 |
| <b>Figura 12.</b> Cromatograma ampliado obtido pela injeção de 1,0 µL da amostra testemunha. ....  | 41 |
| <b>Figura 13.</b> Cromatograma obtido dos ensaios de recuperação de uma amostra fortificada com 25 ng mL <sup>-1</sup> (1LQ) de BFA. ....          | 42 |
| <b>Figura 14.</b> Cromatograma ampliado obtido dos ensaios de recuperação de uma amostra fortificada com 25 ng mL <sup>-1</sup> (1LQ) de BFA. .... | 42 |
| <b>Figura 15.</b> Cromatograma obtido dos ensaios de recuperação de uma amostra fortificada com 75 ng mL <sup>-1</sup> (3LQ) de BFA. ....          | 43 |
| <b>Figura 16.</b> Cromatograma ampliado obtido dos ensaios de recuperação de uma amostra fortificada com 75 ng mL <sup>-1</sup> (3LQ) de BFA. .... | 43 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 17.</b> Cromatograma obtido dos ensaios de recuperação de uma amostra fortificada com $125 \text{ ng mL}^{-1}$ (5LQ) de BFA. ....                                  | 44 |
| <b>Figura 18.</b> Cromatograma ampliado obtido dos ensaios de recuperação de uma amostra fortificada com $125 \text{ ng mL}^{-1}$ (5LQ) de BFA. ....                         | 44 |
| <b>Figura 19.</b> Cromatograma obtido da análise da amostra 1. ....  | 46 |
| <b>Figura 20.</b> Cromatograma ampliado obtido da análise da amostra 1. ....   | 46 |
| <b>Figura 21.</b> Cromatograma obtido da análise da amostra 2. ....  | 47 |
| <b>Figura 22.</b> Cromatograma ampliado obtido da análise da amostra 2. ....   | 47 |
| <b>Figura 23.</b> Cromatograma obtido da análise da amostra 3. ....  | 48 |
| <b>Figura 24.</b> Cromatograma ampliado obtido da análise da amostra 3. ....   | 48 |
| <b>Figura 25.</b> Cromatogramas ampliados obtidos da análise da amostra 3 e da injeção de padrão de BFA derivado com TFAA na concentração de $250 \text{ ng mL}^{-1}$ . .... | 49 |
| <b>Figura 26.</b> Cromatograma obtido da análise da amostra 4. ....  | 49 |
| <b>Figura 27.</b> Cromatograma ampliado obtido da análise da amostra 4. ....   | 50 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1. Propriedades físico-químicas do BFA .....                                 | 9  |
| Tabela 2: Relação de técnicas analíticas para quantificar BFA.....                  | 19 |
| Tabela 3. Descrição das amostras reais de água mineral.....                         | 31 |
| Tabela 4. Condições cromatográficas do método analítico .....                       | 32 |
| Tabela 5. Limite de detecção e limite de quantificação .....                        | 35 |
| Tabela 6. Equação da reta e coeficiente de correlação. ....                         | 38 |
| Tabela 7. Dados obtidos dos ensaios de recuperação referentes à análise de BFA..... | 45 |
| Tabela 8. Resultados da análise de BFA em água mineral.....                         | 50 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|         |   |
|---------|---|
| ANVISA  | Agência Nacional de Vigilância Sanitária                                  |
| BFA     | Bisfenol A  |
| BPA     | Bisphenol A   |
| CG/DCE  | Cromatografia a Gás com Detector de Captura de Elétrons                   |
| CG/EM   | Cromatografia a Gás acoplada à Espectrometria de Massas                   |
| CL/EM   | Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas                 |
| CV      | Coefficiente de Variação  |
| CONAMA  | Conselho Nacional de Meio Ambiente  |
| DE      | Desreguladores endócrinos   |
| DNPM    | Departamento Nacional da Produção Mineral                                 |
| DQI     | Departamento de Química   |
| DHT     | Departamento de Hidráulica e Transportes                                  |
| EAAP    | Extração com Adsorção com Agitação e Pressão ( <i>Stir bar sorptive</i> ) |
| ECSCF   | European Commission Scientific Committee on Food                          |
| EFS     | Extração em Fase Sólida   |
| ELL     | Extração Líquido-Líquido  |
| EPA     | Environmental Protection Agency   |
| ETE     | Estação de Tratamento de Esgoto   |
| EUA     | Estados Unidos da América   |
| ICH     | International Conference on Harmonization                                 |
| INMETRO | Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial     |
| ISSO    | International Standard Organization                                       |
| IUPAC   | International Union of Pure and Applied Chemistry                         |
| LAQUA   | Laboratório de Qualidade Ambiental  |
| LD      | Limite de Detecção  |
| LP-3    | Laboratório de Pesquisa - 3   |
| LQ      | Limite de Quantificação   |
| MEFL    | Micro-extração em Fase Líquida  |
| MEFS    | Micro-extração em Fase Sólida   |
| MRC     | Materiais de Referência Certificados                                      |

|      |  |
|------|--|
| ND   | Não detectável                             |
| PC   | Policarbonato                              |
| PE   | Polietileno                                |
| PEAD | Polietileno de alta densidade              |
| PET  | Polietileno Tereftalato                    |
| PP   | Polipropileno                              |
| PVC  | Policloreto de vinila                      |
| TFAA | Anidrido Trifluoracético                   |
| EU   | União Européia                             |
| UFMS | Universidade Federal de Mato Grosso do Sul |
| UNEP | United Nations Environmental Programme     |

## LISTA DE SÍMBOLOS

|               |  |
|---------------|--|
| %             | Porcento   |
| $\mu\text{L}$ | Microlitro   |
| $\mu\text{g}$ | Micrograma   |
| g             | Gramma   |
| h             | Hora   |
| Kg            | Quilograma   |
| KPa           | Quilopascal  |
| L             | Litro  |
| m             | Metro  |
| mg            | Miligrama  |
| min           | Minuto   |
| mL            | Mililitro  |
| mm            | Milímetro  |
| mmHg          | Milímetros de mercúrio                               |
| mol           | Número de mols                                       |
| ng            | Nanograma  |
| °C            | Graus Celsius  |
| R             | Coefficiente de correlação                           |
| S             | Desvio padrão  |
| s             | Inclinação ou coeficiente angular da curva analítica |
| A             | Alfa   |
| B             | Beta   |

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Este estudo teve a sua origem no Grupo de Química Analítica Ambiental da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), que vem desenvolvendo pesquisas na área de pesticidas e carcinogênicos orgânicos, como o Bisfenol A (BFA), e expressa uma proposta progressiva em prol do desenvolvimento científico e tecnológico dos estudos desenvolvidos em nível mundial sobre os problemas causados pelo BFA.

Atualmente, as maiores preocupações em relação à exposição de humanos e outros animais aos agentes e substâncias químicas que promovem alterações no sistema endócrino humano e nos hormônios, denominados desreguladores endócrinos (DE) são:

- se essas substâncias podem produzir efeitos tóxicos em baixas concentrações;
- se essas substâncias estão presentes em concentrações ambientalmente relevantes que possam ser uma ameaça à saúde de humanos e animais;
- se existe uma concentração limiar abaixo da qual essas substâncias químicas podem ser consideradas como seguras;
- se os novos tipos de ensaios, usados para prever os efeitos causados em organismos expostos, podem realmente fornecer ferramentas para o entendimento do mecanismo de ação dessas substâncias, e
- se esses ensaios podem ser facilmente usados em larga escala para monitorar seus efeitos no meio ambiente.

Embora já existissem, desde o início do século XX, hipóteses prevendo alterações no funcionamento do sistema endócrino de algumas espécies animais expostas a determinadas substâncias químicas tóxicas, apenas recentemente esta importante questão tem recebido atenção por parte da comunidade científica, principalmente devido ao número crescente de publicações que relatam o aumento da incidência de disfunções no sistema endócrino de seres humanos (incluindo a infertilidade masculina) e, mais significativamente, efeitos fisiológicos adversos observados em espécies animais para as quais a relação causa/efeito é mais evidente.

De fato, as evidências observadas em estudos envolvendo moluscos, crustáceos, peixes, répteis, pássaros e alguns mamíferos têm sugerido que possíveis alterações de saúde humana, envolvendo o sistema reprodutivo tais como o câncer de mama e de testículo, podem estar relacionadas à exposição a tais substâncias.

Esta nova ameaça à saúde de espécies animais, incluindo os seres humanos, tem despertado interesse público neste tema, daí o nosso interesse e o foco deste estudo no BFA, dentre as numerosas substâncias químicas, como as dioxinas, PCB's, agrotóxicos, ftalatos, e alquilfenóis que ameaçam nossa fecundidade, inteligência e sobrevivência.

Reforça o nosso interesse no estudo do BFA a preocupação, nos últimos anos, de inúmeros pesquisadores que têm dedicado considerável atenção aos efeitos do BFA reportados em estudos de laboratório, no que diz respeito à reprodução e ao desenvolvimento humano e dos diversos problemas ambientais que surgem a cada momento, muitos deles irreversíveis e de extrema relevância para o ser humano.

Portanto, o problema a ser pesquisado direciona-se a uma pergunta que motiva o desenvolvimento da presente pesquisa: os níveis de concentração do BFA em água mineral.

A proposta deste trabalho foi, portanto, desenvolver e validar metodologia de análise para determinação de BFA em água mineral, utilizando-se extração em fase sólida (EFS) e análise por cromatografia a gás com detector de captura de elétrons (CG-DCE), reportando-se aqui os resultados obtidos nos estudos para o desenvolvimento e validação de metodologia de análise do BFA.

No Capítulo 2 são apresentados os objetivos gerais e específicos do presente trabalho. No Capítulo 3, revisão bibliográfica, foram feitas algumas considerações sobre o BFA destacando-se suas características e evolução e seus efeitos no ambiente e nos seres humanos e de outro fator importante para melhor compreensão do BFA: o sistema endócrino (ação dos hormônios e DE). No Capítulo 4, apresentam-se a preparação das amostras e metodologia utilizada na pesquisa. No Capítulo 5, apresentam-se os resultados, discussão e validação da metodologia e por fim, no Capítulo 6, as conclusões e recomendações.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a contaminação de água mineral por BFA.

### **2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO**

Desenvolver e validar metodologia de análise de BFA em amostras de água mineral, utilizando-se EFS, derivação e análise por CG-EM.

## **3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **3.1 SISTEMA ENDÓCRINO**

Dentre os diversos sistemas que compõem o corpo humano, o sistema endócrino tem vital importância. Cada órgão que compõe este sistema apresenta uma característica fundamental, que é segregar certo tipo de hormônio e cada hormônio tem suas funções, que são principalmente de um efeito regulador em outros órgãos, que estão à distância. Os órgãos – os testículos, os ovários, o pâncreas, as glândulas supra-renais, a tireóide, a paratireóide, a hipófise (pituitária) e o tálamo - que cumprem tal função são glândulas de secreção internas, assim chamadas por não possuírem dutos. Isto não significa que os hormônios fiquem restritos às glândulas em si, pois, após serem produzidos, entram na circulação sanguínea e percorrem todo o organismo (DANGELO & FATTINI, 1988; FERREIRA, 2003).

É inegável que o sistema endócrino mantém estreita relação com outros órgãos que não constituem o seu sistema em si. Um exemplo claro é o fígado, que não faz parte do sistema endócrino, e sim do sistema digestivo, mas que atua em conjunto, na medida em que mantém o equilíbrio hormonal por meio da decomposição do estrógeno e de outros hormônios esteróides, a fim de permitir sua excreção (COLBORN & DUMANOSKI, 2002).

#### **3.1.1 MECANISMO DE AÇÃO DOS HORMÔNIOS**

Os hormônios foram identificados pela primeira vez, em 1902, pelos fisiologistas britânicos William Bayliss e Ernest Starling. Eles demonstraram que uma substância retirada do revestimento do intestino podia ser injetada num cão para estimular o pâncreas a produzir fluido. Eles chamaram essa substância de secretina e cunharam o termo "hormônio", do grego hormo, que significa "pôr em movimento" (SELLMAN, 1996).

Hormônios são substâncias químicas produzidas pelo organismo em diversas glândulas do corpo e que agem em locais específicos regulando ou alterando determinado órgão ou função. São carregados pela corrente sanguínea em níveis ínfimos e agem como uma espécie de mensageiros, provendo comunicação entre diferentes partes do organismo e são eles que ajudam a regular a pressão sanguínea, determinam o crescimento das gônadas e dos caracteres sexuais, regulam o uso dos alimentos, a produção de insulina para queimar o açúcar que ingerimos etc. (SILVA, 1994).

Diferentemente das informações enviadas pelo sistema nervoso, que são transmitidas via impulsos elétricos, se deslocam rapidamente, têm um efeito quase imediato e de curto prazo, os hormônios são mais vagarosos e seus efeitos mantêm-se por um período mais longo de tempo (SELLMAN, 1996).

A maioria dos hormônios é lançada diretamente no sangue, onde circulam através do corpo em concentrações muito baixas. Alguns hormônios trafegam intactos pela corrente sanguínea. Outros já precisam de uma substância portadora, como uma molécula de proteína, para se manterem dissolvidos no sangue. Essas portadoras também funcionam como reservatórios de hormônios, mantendo constante a concentração hormonal e protegendo o hormônio a que estão ligadas contra decomposição química no decorrer do tempo (SELLMAN, 1996).

Os hormônios desempenham um papel fundamental no crescimento e desenvolvimento, na reprodução e na diferenciação sexual e ainda na formação do sistema nervoso e imunológico. Variações destas substâncias para mais ou para menos podem alterar funções e características de órgãos e sistemas, principalmente em períodos críticos do crescimento e de formação dos órgãos e tecidos, como ocorre durante a fase embrionária e de crescimento rápido. Como age à distância de onde são produzidos, os hormônios têm um receptor específico no seu local de atuação, que é a forma do organismo reconhecer a substância - uma espécie de mecanismo de chave e fechadura. Assim, para cada hormônio específico, há receptores que o reconhecem em que ele se encaixa para ser absorvido e agir no local (SILVA, 1994).

Os hormônios agem em determinadas células do corpo, chamadas células-alvo. Uma célula-alvo responde a uma molécula de hormônio por possuir receptores específicos à interação molecular. A ação de um hormônio pode ser comparada à transmissão de rádio. As ondas de rádio propagam-se pelo ar, mas só é possível ouvi-las empregando-se um receptor ajustado na frequência correta. A interação hormônio-receptor pode ocorrer de duas maneiras:

- Agonista: uma molécula hormonal liga-se a um receptor provocando uma resposta que terá um efeito biológico.

- Antagonista: um hormônio liga-se ao receptor bloqueando a ação agonista de outro hormônio. Funciona como um bom burocrata – não tem um papel útil, mas também não permite a ação de quem quer contribuir. Hormônios antagonistas são amplamente utilizados em formulações farmacêuticas (SODRÉ et al., 2007).

Os hormônios não existem somente em seres humanos, eles estão presentes na natureza tanto em outros animais como nos vegetais. Entre os vertebrados, há bastante

semelhança entre os hormônios existentes nas diversas espécies tanto em sua forma quanto em sua função. Nos vegetais, embora tenham outras estruturas e outras funções, o mecanismo pelo qual eles atuam é semelhante. Esta é a razão pela qual uma substância que interfira no mecanismo de ação hormonal pode atuar alterando o desenvolvimento, reprodução e funções de seres vivos de diversas espécies a ela expostos (SILVA, 1994).

A especificidade na ação de hormônios faz com que sejam necessárias concentrações pequenas destas substâncias na corrente sanguínea para que a resposta esperada seja conseguida. Conseqüentemente, hormônios possuem uma elevada potência de ação. No entanto, os receptores celulares não se ligam exclusivamente aos hormônios. Eles são capazes de interagir com outras moléculas orgânicas presentes na corrente sanguínea. É neste momento que os problemas relacionados ao sistema endócrino começam (SODRÉ et al., 2007).

### **3.2 DESREGULADORES ENDÓCRINOS (DE)**

São agentes e substâncias químicas sintetizados artificialmente que promovem alterações no sistema endócrino humano e nos hormônios. Em inglês, os autores vêm usando o termo *endocrine disruptors* e no Brasil se usam várias terminologias, como desreguladores endócrinos, disruptores endócrinos e interferentes endócrinos (WAISSMANN, 2002).

A maioria dos DE é constituída de moléculas pequenas com a capacidade de mimetizar, de forma agonista ou antagonista, alguns hormônios esteroidais ou da tireóide o que compromete os processos reprodutivos, de desenvolvimento e de manutenção da homeostase celular (SUMPTER, 1998; SADIK & WITT, 1999).

Conforme Birkett e Lester (2003), os DE ao perturbarem o funcionamento do sistema endócrino mimetizando hormônios naturais provocam a formação de mais receptores hormonais, o que acarreta o bloqueio de sítios receptores na célula afetada, acelera a síntese e a secreção dos hormônios naturais, desativando com isso as enzimas responsáveis pela secreção de hormônios dificultando a interação desses hormônios com os receptores celulares.

Muitas dos DE são persistentes no meio ambiente, acumulam-se no solo, no sedimento de rios e são facilmente transportados a longas distâncias pela atmosfera de suas fontes. Acumulam-se ao longo da cadeia trófica, representando por isso, um sério risco à saúde daqueles que se encontram no topo da cadeia alimentar, ou seja, os humanos (MEYER, SARCINELLI, JOSINO, 1999).

Os DE são substâncias orgânicas ou inorgânicas, seu uso pode acontecer tanto em áreas urbanas ou rurais, podem aparecer como resíduos ou subprodutos derivados de usos industriais dos mais diversos. São encontrados em depósitos de lixo, contaminando solo, lençóis freáticos, mananciais de água para abastecimento público e, ainda, pela queima de resíduos hospitalares e industriais em incineradores, a exemplo das dibenzo-p-dioxinas policloradas e dos dibenzofuranos policlorados. Nas áreas hospitalares, o uso de alguns tipos de medicamentos e produtos para esterilização de equipamentos cirúrgicos já são comprovadamente citados como interferentes endócrinos e oferecem risco aos profissionais da área (ASSUNÇÃO & PESQUERO, 1999; BAIRD, 2002; XELEGATI & ROBAZZI, 2003).

No lixo domiciliar há DE. Teves (2001) indicou com clareza que mercúrio e chumbo foram encontrados no lixo coletado em São Paulo/SP e Sisino e Oliveira (2003) comprovaram haver cádmio, chumbo, manganês e mercúrio no chorume captado em aterros e lixões.

Os primeiros relatos de substâncias químicas DE indicam o dietilestilbestrol, medicamento usado por mulheres entre os anos 50 e 70, que apresentou resultados desastrosos, dentre eles o câncer da vagina e infertilidade nas filhas nascidas de mães que o usaram, o que provou seu efeito teratogênico, além de deformações irreversíveis do útero em filhas nascidas de mães que o usaram. Muitas destas filhas só vieram a descobrir os problemas aos vinte anos de idade (SONNENSCHNEIN & SOTO, 2002; COLBORN & DUMANOSKI, 2002).

Também os homens que trabalharam nas fábricas do medicamento tiveram crescimento das mamas e meninos filhos de mães que usaram o medicamento durante a gravidez vieram a sofrer de criptorquidia, a ausência de testículo no escroto (COLBORN & DUMANOSKI, 2002).

A geração dos DE pode ser intencional e/ou como subprodutos não intencionais de processos industriais tais como o branqueamento de papel e celulose, emissões das fundições de aço e de motores de veículos bem como na queima de produtos que contenham cloro como o PVC, seja em incineradores, caldeiras de fundo de quintal ou vindo de incêndios de prédios. (GOETTLICH, 2009)

Os DE mais insidiosos são os produtos químicos sintetizados pelo homem. Estamos rotineiramente expostos a eles na maioria das áreas de nosso dia-a-dia como em casa, no trabalho e no lazer. Fazem parte desta lista: produtos de beleza e de higiene (cosméticos, filtros solares, perfumes, sabonetes); fármacos (pílula anticoncepcional); selantes dentários;

solventes; agrotóxicos e os plásticos. Eles são encontrados no meio ambiente em concentrações da ordem de  $\mu\text{g L}^{-1}$  até  $\text{ng L}^{-1}$  e são suspeitos de causarem efeitos adversos à saúde humana e animal. (GOETTLICH, 2009; SANTAMARTA, 2001).

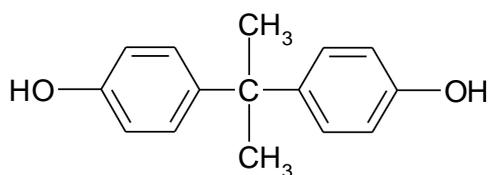
O organismo dos animais e humanos está subordinado a uma série de eventos, complexos, integrados e conectados, dos quais a liberação de hormônios aos vários órgãos é vital. Quando o ritmo da liberação e/ou a quantidade de hormônios são desarranjados, os resultados podem ser devastadores e definitivos (GOETTLICH, 2009).

A disfunção pode ser tanto na forma de quantidades inapropriadas como na desconexão da resposta ao estímulo, bloqueando os efeitos hormonais em partes sensíveis do organismo a isto. Pode também ser pela estimulação ou inibição do sistema endócrino que poderá produzir uma quantidade inadequada de hormônios. Qualquer uma destas interferências no sistema endócrino pode afetar o desenvolvimento físico em geral, do aparelho reprodutivo, do desenvolvimento cerebral, do comportamento, da regulação da temperatura e de muitos outros (GOETTLICH, 2009).

### 3.3 BISFENOL A (BFA)

O BFA, 2,2-bis(4-hidroxifenil)propano, é uma substância química produzida em grandes quantidades para uso principalmente na produção de plásticos policarbonato e resinas epóxi. A produção mundial foi estimada em 2,5 milhões de toneladas em 2001 (BILES et al., 1997; FÜRHACKER, SCHARF, WEBER, 2000; STAPLES et al., 2002 apud LEANDRO, 2006).

Embora possua pouca homologia estrutural em relação ao estradiol, apresenta semelhança ao dietilestilbestrol, apresentando dois grupos hidroxila-fenólicos (figura 1), sendo obtido a partir da condensação de 2 mols de fenol com 1 mol de acetona (LEANDRO, 2006; STAPLES et al., 1998).



**Figura 1.** Fórmula estrutural do BFA.

A maioria do BFA é utilizada na manufatura de policarbonato (60%) e resina epóxi (30%) com os 10% remanescentes sendo utilizados para produção de resinas poliéster. O policarbonato, composto de monômeros de BFA, possui várias qualidades comerciais desejáveis como transparência, moldabilidade e força de impacto alta (NIRA & STEINMETZ, 1998).

A exposição humana ao BFA não é insignificante tendo em vista que policarbonatos e resinas epóxi tendo como base o BFA apresentam varias aplicações: garrafas de bebidas, potes de comida de bebê, revestimento das latas de alimento para prevenir corrosão, fabricação de discos compactos, selantes dentários, equipamento de segurança e dispositivos médicos (NIRA & STEINMETZ, 2003; CERHR, 2008).

Sob condições ambientais, o BFA é um sólido, vendido na forma de pastilhas, flocos ou cristais e tem um leve odor "fenólico" ou hospitalar. É um composto de média polaridade, moderadamente solúvel em água sob temperatura ambiente ( $300 \text{ mg L}^{-1}$ ) e que se dissocia sob condições alcalinas. Na Tabela 1 são apresentadas as propriedades físico-químicas do BFA (STAPLES, et al., 1998; CERHR, 2008; LEANDRO, 2006).

**Tabela 1.** Propriedades físico-químicas do BFA

| Parâmetro            | Valor                                  |
|----------------------|--|
| Massa molar          | $228 \text{ g mol}^{-1}$               |
| Fórmula molecular    | $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_2$ |
| Densidade            | $1.195 \text{ g mL}^{-1}$              |
| Ponto de ebulição    | $398^\circ\text{C}$                    |
| Ponto de fusão       | $155^\circ\text{C}$                    |
| pKa                  | 9,59 - 11,30                           |
| Solubilidade em água | $300 \text{ mg L}^{-1}$                |
| Pressão de vapor     | $5,3 \times 10^{-6} \text{ KPa}$       |

Fonte: LEANDRO, 2006

Na União Européia, ECSCF (European Commission Scientific Committee on Food) e nos Estados Unidos, EPA (Environmental Protection Agency) estabeleceram limites oficiais permitidos para a migração de BFA em alimentos, sendo que para ambos os órgãos regulamentadores o valor máximo é de  $3 \text{ mg Kg}^{-1}$ . No Brasil não existem limites oficiais para o BFA no ambiente ou em alimentos (LYONS, 2000; LEANDRO, 2006).

Autores têm descrito em seus estudos os limites para BFA, adotando a faixa permitida pela EPA para o grupo dos fenóis ( $60 - 400 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (BASHEER, LEE, TAN, 2004).

No Brasil, a Portaria n.º 518/2004 do Ministério da Saúde que fixa o limite máximo de contaminantes presentes em água potável, não menciona limite permitido para fenóis totais. O Ministério do Meio Ambiente, por meio da Resolução 357/2005 do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) determina que o teor máximo permitido para fenóis em águas naturais é de  $3 \mu\text{g L}^{-1}$ , para as classes I e II, sendo de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  para a classe III (BRASIL, 2004; BRASIL, 2005).

### 3.3.1 BFA NO MEIO AMBIENTE

Vários sistemas bióticos e abióticos são responsáveis pela degradação e dispersão do BFA no meio ambiente. Além de o BFA ser solúvel em água, este está sujeito à adsorção por sedimentos e à biodegradação, podendo possivelmente sofrer fotodegradação (STAPLES et al., 1998).

Fromme e colaboradores (2002) encontraram concentrações relativamente baixas de BFA em águas superficiais ( $0,5$  a  $410 \text{ ng L}^{-1}$ ) e em amostras de efluentes de Estações de Tratamento de Esgoto - ETE ( $18$  a  $702 \text{ ng L}^{-1}$ ), mas concentrações mais elevadas em sedimentos ( $10$  a  $190 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ) e no lodo de esgoto ( $4$  a  $1360 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ). Além disso, efluentes de aterros sanitários também podem conter quantidades significativas de BFA. Mesmo apresentando concentrações consideráveis em efluentes de ETE, a maior fonte de liberação de BFA para os ambientes aquáticos vem de processos industriais. A produção de papel, por exemplo, contribui com cerca de 150 toneladas anuais de BFA, apenas na Europa, enquanto que outros processos industriais tais como as produções de PVC e de resinas contribuem com, aproximadamente, 35 toneladas anuais.

Os estudos conduzidos nos EUA (STAPLES et al., 1998), Alemanha (BOLZ, KÖRNER, HAGENMAIER, 2000; FROMME et al., 2002; HEEMKEN et al., 2001) Japão (MATSUMOTO, 1982) e Holanda (BELFROID et al., 2002; HENDRIKS et al., 1994) mostram que os níveis de BFA encontrados em rios são, em média, inferiores a  $8 \text{ ng mL}^{-1}$ .

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).

Basheer e colaboradores (2004) encontraram níveis de contaminação que variaram de  $13,3$  a  $213,1 \text{ ng g}^{-1}$  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 e, conseqüentemente, num problema de saúde pública, que afeta o mundo todo.

Estudos realizados por Pearce e Mackenzie (1999), apontaram que muitos compostos sintéticos persistentes são transportados mundialmente e são acumulados em ambientes até então intocados, como o norte do Canadá e a Antártida. Para esses autores, a explicação mais provável é que os poluentes evaporam na atmosfera e são então transportados pelas correntes de ar até as regiões polares, onde foram detectados elevados níveis de contaminação por compostos sintéticos em focas, ursos polares e baleias.

Geralmente, a possibilidade de se inalar altos níveis de BFA do ar é muito pequena. Porém, trabalhadores de companhias que produzem produtos baseados no BFA são exceções, como demonstra o estudo de Hanaoka et al. (2002), onde se constata que a concentração de BFA na urina era maior nos pulverizadores de resinas epóxi do que em trabalhadores que nunca tinham entrado em contato com o BFA ou seus derivados. Rudel e colaboradores (2001) encontraram concentrações de BFA oscilando entre 2 a 208 ng m<sup>-3</sup> em 3 de 7 amostras de ar coletadas em uma residência e prédio comercial, onde se trabalhava com plásticos.

Após a Segunda Guerra Mundial, o campo dos materiais foi revolucionado pelo advento dos polímeros sintéticos que, com a industrialização moderna tornou as embalagens como parte anexa do produto de consumo, contribuindo para maior geração de resíduo polimérico. Embora represente somente cerca de 4 a 7% em massa, os materiais poliméricos ocupam de 15 a 20% do volume do resíduo (BIANCO et al., 2008; D'ALMEIDA & VILHENA, 2000).

Esses resíduos são gerados a partir das residências e estabelecimentos comerciais, e são constituídos, em sua maior parte, por embalagens plásticas descartáveis (sacos, potes, frascos, garrafas, entre outros), e podem representar volumes consideráveis em algumas cidades, como é o caso de São Paulo onde foram coletados no ano de 2000, como lixo, cerca de 900 toneladas/dia de materiais plásticos (D'ALMEIDA & VILHENA, 2000).

Depositados em aterros sanitários esses resíduos plásticos dificultam a compactação e prejudicam a decomposição dos materiais biologicamente degradáveis, pois criam camadas impermeáveis que afetam as trocas de líquidos e gases gerados no processo de biodegradação da matéria orgânica (D'ALMEIDA & VILHENA, 2000), constituindo assim, uma das formas de liberação de BFA para o meio ambiente, conforme assinalam Dezotti & Bila (2007) em seu estudo “Desreguladores endócrinos no meio ambiente e conseqüências”.

A contaminação do solo por BFA pode estar correlacionada ao 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).

Li e colaboradores (2008) mostram que a presença de metais pesados e surfactantes catiônicos no solo causam um significativo aumento na absorção de BFA.

### **3.3.2 EFEITOS À SAÚDE HUMANA E ANIMAL**

Nos estudos “*in vitro*”, foi demonstrado que o BFA é uma substância com ação estrogênica fraca, aproximadamente 1.000-15.000 vezes menos potente do que o estradiol ou o estriol. O BFA efetivamente compete com o estradiol, ligando-se tanto ao receptor estrogênico  $\alpha$  como ao  $\beta$ , com afinidade pelo menos 1.000 vezes menor que o estradiol. Acredita-se que o BFA exibe atividade estrogênica na ordem de  $1 \text{ ng mL}^{-1}$  (GOULD et al, 1998; KUIPER et al, 1998; LEANDRO & MARCHI, 2006; MILLIGAN & BALASUBRAMANIAN, 1998).

O BFA causa impactos significativos no desenvolvimento de fetos de inúmeras espécies. 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. Esse conjunto de anormalidades 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 afeta também 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; ROY, COLERANGLE, SINGH, 1998; SAUNDERS et al., 1997).

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 de gaiolas ou 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).

A exposição humana pode surgir através de uma série de fontes, particularmente do contato direto com alimentos contidos em plásticos com BFA. A lixiviação do BFA dos materiais plásticos usados nas linhas de alimentos e latas de bebidas tem recebido atenção especial. Outras rotas de exposição que são um foco de atenção incluem a lixiviação do BFA das mamadeiras dos bebês e de recheios de próteses dentais e selantes (LYONS, 2000).

### **3.4 ÁGUA MINERAL E BFA**

O consumo de água engarrafada tem crescido de maneira bastante acentuada nos últimos anos, inclusive em lugares onde a administração pública garante água potável de qualidade. A extração, engarrafamento, transporte e posterior eliminação deste produto provocam diversos impactos no meio ambiente. Mesmo assim, alguns peritos lembram que água engarrafada não é a solução para os problemas de escassez de água no mundo (MUERZA, 2007).

A maioria das garrafas é feita de polietileno tereftalato (PET), um plástico derivado do petróleo, das quais podem migrar determinadas substâncias, como o BFA, prejudicial para a saúde (MUERZA, 2007).

Estudos de laboratório demonstram que o BFA biologicamente ativo é liberado a partir de garrafas de policarbonato seguindo a simulação de uso normal. Por isso, acredita-se que uma importante fonte de BFA esteja na ingestão de alimentos e bebidas que tenham estado em contato resinas epóxis ou plásticos policarbonato (BREDE, FJELDAL, HERIKSTAD, 2003; KANG et al., 2006; LE et al., 2008).

Biles e colaboradores (1997) investigaram a migração do BFA de cinco galões de água (estocada por 39 semanas) e a quantidade de BFA encontrado não atingiu  $5\mu\text{g L}^{-1}$ .

Lambert e Larroque (1997) em suas pesquisas encontraram BFA e outros contaminantes em água mineral e vinhos armazenados em garrafas plásticas.

Estudos realizados por Onn, Woon e Leng (2005) constataram que temperaturas elevadas, bem como soluções ácidas e álcalis resultam em aumento da migração do BFA. Após incubação por 8, 72 e 240 h em solventes que simulavam alimentos (10% de etanol a

70 °C e óleo de milho a 100 °C), a média da migração do BFA aumentou com a duração do tempo de incubação.

Outros estudos também constataram concentrações mais elevadas de lixiviação de BFA em garrafas de plástico policarbonato reutilizadas em relação às novas: a lixiviação do BFA foi observada a partir de gaiolas de policarbonato dos animais após uma semana de incubação à temperatura ambiente, constatando maiores níveis de migração de BFA das gaiolas reutilizadas em relação às novas (HOWDESHELL et al., 2003).

Do mesmo modo, observou-se que mamadeiras de plástico submetidas à utilização simulada, incluída lavagem, aquecimento e escovação, após incubação em água a 100 °C durante uma hora, a quantidade liberada de BFA excedia à das novas mamadeiras (BREDE, FJELDAL, HERIKSTAD, 2003).

Como conseqüência, o Canadá proibiu o uso de mamadeiras de plástico, a fim de reduzir a exposição das crianças ao BFA (HEALTH CANADA, 2008) e medidas nesse sentido estão sendo tomadas por vários Estados Norte-Americanos (AUSTEN, 2008). Alguns fabricantes de garrafas de policarbonato eliminaram voluntariamente o BFA de seus produtos (NALGENE, 2008), e vários revendedores retiraram as garrafas de policarbonato de suas lojas (MUI, 2008).

No entanto, essas ações têm servido mais como medida preventiva, dado que nenhum estudo epidemiológico avaliou as conseqüências fisiológicas da utilização ou reutilização de garrafas de policarbonato. Por essa razão, Carwile e colaboradores (2009) procederam ao estudo do impacto do consumo de bebidas frias, em garrafas de policarbonato sobre concentrações de BFA na urina entre uma população no Harvard College, chegando à conclusão que o consumo de bebidas frias provenientes de garrafas de policarbonato está associado a um aumento substancial de BFA na urina.

### **3.4.1 EMBALAGENS PARA ÁGUA MINERAL**

Os materiais usados para o envase de água mineral incluem o plástico, com aproximadamente 89% e o vidro, com aproximadamente 11% (DATAMARK, 2003a).

O baixo peso e custo da embalagem plástica apresentam-se como uma boa alternativa frente ao vidro.

As principais embalagens plásticas utilizadas no acondicionamento de água mineral destinada ao consumo de mesa são o PET, que representa 88,6% do mercado, o polipropileno

(PP), representando 9,0% e o policloreto de vinila (PVC), representando 2,4%. No caso do envase de água mineral em garrações retornáveis, os principais polímeros utilizados são o PET, o polietileno de alta densidade (PEAD), o PVC, o PP e o policarbonato (PC), que representa 95,7% do segmento (DATAMARK, 2003b). O PET está entrando no mercado de garrações de 20 L para água mineral, com a vantagem de apresentar um maior brilho em relação ao PP, e uma redução de custos em comparação ao PC (RETO, 2003).

### 3.4.1.1 POLIETILENO TEREFALATO (PET)

O PET é classificado como sendo um material termoplástico, e apresenta características de um material cristalino, devido ao seu arranjo molecular, isto é, a forma e simetria das moléculas. Os polímeros, quando cristalinos, não podem formar um cristal regular, uma vez que os elementos de emparelhamento não são idênticos, devido às variações possíveis de conformação das macromoléculas. Todos os polímeros cristalizáveis apresentam como características específicas a semicristalinidade, decorrente da presença de frações desordenadas entre os domínios ordenados (UNGARI, 1999).

Derivado da policondensação do ácido tereftálico e do etilenoglicol, o polietileno tereftalato (PET) apresenta excelentes resistências térmica, mecânica e química, podendo ser aplicado como fibra, filme para embalagens, garrafas para bebidas e reforço em materiais de construção civil, devido a sua temperatura de transição vítrea (~ 70 °C), alta temperatura de fusão (~ 250 °C) e boas propriedades mecânicas em temperaturas superiores a 175 °C (UNGARI, 1999).

Diversas pesquisas têm demonstrado os riscos à saúde associados à utilização de embalagens plásticas utilizadas como vasilhame de água e refrigerantes. Esses vasilhames, garrafas PET, podem conter quantidades substanciais de produtos químicos que imitam ou alteram o hormônio estrógeno (CORTEZ, 2009).

Evandri et al. (2000), verificaram o efeito toxicológico de substâncias químicas que migraram para água mineral acondicionada em garrafas PET sob diferentes condições de armazenamento (à 40 °C no escuro, à 25 °C com e sem exposição à luz solar), usando o teste com *Allium cepa*. Os resultados revelaram que as substâncias químicas migradas induziram aberrações citogenéticas independentemente das condições de estocagem, as quais foram evidenciadas após oito semanas de armazenamento e, portanto, dentro do prazo de validade do produto.

Wagner e Oehlmann (2009), em seu estudo, utilizaram o molusco *Potamopyrgus antipodarum* (Gastropoda), como espécime de teste, considerando que é especialmente sensível ao estrogênio. Comunidades foram ‘hospedadas’ em garrafas/embalagens de vidro, de PET e de *Tetra Pak*, de forma que fosse possível acompanhar a sua reprodução. Os espécimes “hospedados” nas garrafas PET tiveram uma taxa de reprodução equivalente ao dobro das garrafas de vidro. Os espécimes jovens, nascidos nas garrafas PET apresentaram elevados índices de estrogênio, equivalente a 25 ng L<sup>-1</sup> de água de etinilestradiol, um potente estrogênio sintético de pílulas anticoncepcionais. Os pesquisadores, para fins de avaliação da extensão potencial da contaminação, estudaram 20 marcas conhecidas de água mineral, sendo 9 em garrafas PET, 9 em vidro e 2 *Tetra Pak*. A água foi testada em tubos de ensaio para identificar o estrogênio, usando como referência o 17-beta estradiol, um dos mais potentes estrogênios de espécies mamíferas. As garrafas de vidro mostraram uma pequena ou inexistente contaminação por estrogênio. Das 9 marcas embaladas em PET, 5 apresentaram grande presença de estrogênio. O mesmo ocorreu nas embalagens *Tetra Pak* com grande presença de PET em sua constituição, demonstrando o risco potencial dessas embalagens.

### 3.4.1.2 POLICLORETO DE VINILA (PVC)

Segundo BLASS (1988) o PVC é um dos mais importantes termoplásticos sintéticos em uso. Sua resina pura é caracterizada pela dureza e rigidez, mas a introdução de modificadores permite qualquer grau desejado de amolecimento, fornecendo materiais coriáceos e em alguns casos bastantes flexíveis.

O PVC ocupa um lugar de destaque entre os termoplásticos presentes no cotidiano e devido à necessidade de incorporação de aditivos durante o seu processamento, apresenta características que o tornam adaptável a múltiplas aplicações, sendo considerado um dos plásticos mais versáteis (PASSADOR, PESSAN, RODOLFO, 2006).

Aproximadamente 80% do PVC consumido no mundo são produzidos através de polimerização do monômero em suspensão. Por este processo é possível obter resinas de PVC adequadas à produção de tubos e conexões, perfis, isolamento de fios e cabos elétricos, entre outras aplicações (PASSADOR, PESSAN, RODOLFO, 2006).

A presença do átomo de cloro na estrutura química do PVC o torna naturalmente resistente à propagação de chamas. Além disso, confere polaridade, que permite sua mistura com uma gama de aditivos muito maiores que a de qualquer outro termoplástico, possibilitando a preparação de formulações com propriedades e características adequadas a

cada aplicação (PASSADOR, PESSAN, RODOLFO, 2006).

O PVC é considerado um polímero amorfo ou de baixa cristalinidade (máxima de 15%), devido à disposição espacial randômica dos átomos de cloro na cadeia polimérica. O PVC é susceptível a reações de degradação quando exposto ao calor, a agentes oxidantes e ao intemperismo, afetando suas propriedades durante o processamento e uso final. A aditivação do PVC proporciona a obtenção de compostos que são possíveis de serem processados, possibilitando a obtenção de uma ampla gama de produtos com as características desejáveis para cada aplicação (PASSADOR, PESSAN, RODOLFO, 2006).

### 3.4.1.3 POLIPROPILENO (PP)

PP é um termoplástico semicristalino e apresenta densidade em torno de  $0,90 \text{ g cm}^{-3}$ , com cristalinidade ao redor de 50%. Apresenta temperatura de fusão em  $165 \text{ }^\circ\text{C}$  e temperatura de transição vítrea ao redor de  $0^\circ \text{ C}$  (LIEBERAN & BARBE, 1987). As propriedades mecânicas do polipropileno são fortemente influenciadas pela massa molar, as quais introduzem orientações, tensões, etc. (WHITELEY et al., 1982).

O PP é considerado um termoplástico *commoditie*, sendo utilizado em moldagem por injeção, sopro e extrusão (geral, termoformagem, fibras, filmes). Essa variedade de produtos requer uma seleção cuidadosa do grade de acordo com as características do produto e dos equipamentos de processamento (WHITELEY et al., 1982).

A grande diversidade de produtos de PP é devido a sua facilidade de processamento, boas propriedades mecânicas (alta resistência à tração e rigidez, aliada a tenacidade, estabilidade dimensional sob altas temperaturas), alta resistência química, eficiente barreira à umidade e transparência quando orientado, baixo custo e baixa densidade (LIEBERAN & BARBE, 1987; PRIOLEAU, 1995).

É a resina que registra maior crescimento nos mercados brasileiro e mundial. O notável crescimento do consumo de PP se deve às novas aplicações e substituições de outros materiais como PVC (12%), PE (10%) e metais (7%) e materiais de engenharia. Por ser um material adequado a formulações, tem o principal campo em aplicações de engenharia como em autopeças (a fração de PP chega a 50% /m do total de plásticos utilizados nos carros de passeio europeu) e nos eletrodomésticos (BERGER et al., 1999).

#### **3.4.1.4 VIDRO**

Atualmente os vidros são utilizados nos mais variados ramos das atividades humanas, em casa, na ciência, na indústria e mesmo em arte, pois eles podem ser ajustados às suas finalidades (AKERMAN, 2000). Devido à sua vasta faixa de composição química, apresentam uma ampla variação de propriedades óticas, térmicas, elétricas, mecânicas e químicas.

Para o segmento de alimentos e bebidas, o vidro de embalagem é constituído basicamente pelo óxido de silício ( $\text{SiO}_2$ ) ou sílica, e pelos óxidos de sódio ( $\text{Na}_2\text{O}$ ) e de cálcio ( $\text{CaO}$ ) e é denominado sodo-cálcico. Além disso, são introduzidos outros óxidos, como o magnésio ( $\text{MgO}$ ) e o alumínio ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), com o objetivo de aumentar a resistência química e mecânica (DANTAS, 2004).

O vidro é um dos poucos materiais de embalagem que pode ser considerado de elevada durabilidade química e inerte à maioria das substâncias conhecidas. Apenas o ácido fluorídrico ( $\text{HF}$ ) dissolve o vidro de forma intensa (JAIME e DANTAS, 2005).

Contudo, dependendo da composição do vidro, especialmente o vidro sodo-cálcico em presença de água (líquida, umidade ou solução aquosa), pode sofrer uma espécie de “corrosão química”, podendo levar até mesmo a alterações estruturais do material. Esta corrosão poderá ocorrer de forma mais ou menos intensa dependendo ainda do pH da solução, sendo que estudos realizados demonstram que o vidro é mais resistente a soluções ácidas e levemente básicas ( $\text{pH} < 9$ ), porém menos resistente a soluções básicas (RAWSON, 1980).

De acordo com a Resolução 27/96, que aprova o regulamento sobre embalagens de vidro, as embalagens produzidas com vidro tipo sodo-cálcico, desde que não possuam nenhum tipo de decoração cerâmica aplicada na superfície que deverá entrar em contato com o produto alimentício, não apresenta restrição de uso para contato com alimentos, independentemente da coloração, formato ou capacidade volumétrica do artigo de vidro (BRASIL, 1996).

### **3.5 TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA O BFA**

Algumas das técnicas analíticas utilizadas para o BFA são apresentadas na Tabela 2.

**Tabela 2:** Relação de técnicas analíticas para quantificar BFA

| MATRIZ               | TÉCNICA            | PRÉ-TRATAMENTO    | LD/ LQ                       | REC %           | BFA NA AMOSTRA                  | AUTOR                                   |
|----------------------|--------------------|-------------------|------------------------------|-----------------|---------------------------------|---|
| Água de superfície   | CG/EM              | EFS               | LD: 0,002 µg L <sup>-1</sup> | 119             | 0,2 – 4 µg L <sup>-1</sup>      | AZEVEDO et al., 2001                    |
| Água residual urbana | CG/EM              | EFS               | LQ: 150 ng L <sup>-1</sup>   | 95 – 105        | -                               | BALLESTEROS et al., 2006                |
| Água                 | CG/EM              | EFS               | LD: 0,05 ng L <sup>-1</sup>  | 101 – 106       | -                               | BOLZ, KÖRNER, HAGENMAIER, 2000          |
| Água                 | CG/MS              | EFS               | LD: 1,5 pg µL <sup>-1</sup>  | 83 -105         | 22 -26 pg µL <sup>-1</sup>      | COSTA, 2008                             |
| Água                 | CG/EM              | MEFS <sup>a</sup> | LD: 15 µg L <sup>-1</sup>    | 104.9           | -                               | HALALEH et al., 2001                    |
| Água de superfície   | CG/EM              | ELL <sup>b</sup>  | LD: 0,17 ng L <sup>-1</sup>  | 80              | 19,1 – 106,5 ng L <sup>-1</sup> | JIN et al., 2004                        |
| Água de rio          | CG/EM              | EAAP <sup>c</sup> | LD: 2 pg mL <sup>-1</sup>    | 99,3 – 103      | 7,2 – 26,8 pg mL <sup>-1</sup>  | KAWAGUCHI et al., 2004b                 |
| Água                 | CL/EM <sup>d</sup> | EFS               | LD: 1 ng L <sup>-1</sup>     | 99,8            | 39 – 47 ng L <sup>-1</sup>      | KAWAGUCHI et al., 2005                  |
| Água de rio          | CG/EM              | MEFL <sup>e</sup> | LD: 2 pg mL <sup>-1</sup>    | 98.3 –<br>104.1 | -                               | KAWAGUCHI et al., 2006                  |
| Água de rio          | CG/EM              | EFS               | LD: 5,3 ng L <sup>-1</sup>   | 80,6 - 98       | 9 – 24 ng L <sup>-1</sup>       | LIU, ZHOU, WILDONG, 2004                |
| Água                 | CG/EM              | EFS               | LD: 5 ng L <sup>-1</sup>     | 58              | -                               | MOL, SUNARTO, STEIJGER, 2000            |
| Água                 | CG/EM              | MEFS              | LD: 0,3 µg L <sup>-1</sup>   | 23,6            | -                               | MÜLLER et al., 2003                     |
| Água de rio          | CG/EM              | EAAP              | LD: 0,6 ng L <sup>-1</sup>   | 85,3 –<br>105,9 | -                               | NAKAMURA & DAISHIMA, 2004               |
| Água                 | CL/EM              | EFS               | LD: 6,3 ng L <sup>-1</sup>   | 81              | -                               | RODRIGUEZ-MOZAZ, ALDA,<br>BARCELÓ, 2004 |
| Água residual        | CG/EM              | ELL               | LD: 0,02 µg L <sup>-1</sup>  | -               | 0,02 – 0,5 µg L <sup>-1</sup>   | VÍLCHEZ et al., 2001                    |
| Água residual urbana | CG/EM              | ELL               | LD: 0,3 ng L <sup>-1</sup>   | 99,83           | -                               | ZAFRA et al., 2003                      |

<sup>a</sup> Microextração em fase sólida; <sup>b</sup> Extração líquido-líquido; <sup>c</sup> Extração com adsorção com agitação e pressão (*Stir bar sorptive*) ; <sup>d</sup> Cromatografia líquida acoplada à detector por espectrometria de massas; <sup>e</sup> Microextração em fase líquida

### 3.6 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA

O processo de validação de um método analítico engloba seu desenvolvimento e adaptação ou mesmo a implementação de um método já estabelecido, estimando sua eficiência laboratorial. Considera-se validado o método quando suas características estiverem conforme pré-requisitos estabelecidos. Na validação de um método analítico, demonstra-se que ele é adequado ao que se propõe (BRITO et al., 2003).

Definições existem muitas sobre a validação e são de interesse crescente dos órgãos reguladores e credenciadores. A maior agência reguladora do País, nessa área, é Agência Nacional de Vigilância Sanitária, mais conhecida por ANVISA e afirma que 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, exatidão, adequados à análise (ANVISA, 2003).

Outro órgão regulador bem conhecido das empresas e dos consumidores é o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial, INMETRO, que define a validação como sendo a comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos (INMETRO, 2003).

A validação pode dar-se em um único laboratório, validando-se um método local ou adaptando outro, de local diferente, para comprovar-se sua eficiência. Costuma-se usar essa validação no laboratório nas fases iniciais do desenvolvimento de uma metodologia e na publicação de artigos em revistas científicas, onde se avaliam as várias características de desempenho de validação da metodologia, não se importando com a sua reprodutibilidade (RIBANI et al., 2004).

Por outro lado, pode acontecer também que a validação envolva a totalidade das características de desempenho de um estudo entre vários laboratórios, estabelecendo-se a reprodutibilidade e a incerteza associada à metodologia e nesse caso, a validação é conhecida como sendo uma validação completa e é usada para testar-se o comportamento de determinada matriz nos vários laboratórios. Assim aprovada, a metodologia poderá ser aceita como oficial para uma determinada aplicação (RIBANI et al., 2004).

Organizações nacionais (ANVISA; INMETRO) e internacionais como a ISO (International Standard Organization), a IUPAC (International Union of Pure and Applied

Chemistry) e a ICH (International Conference on Harmonization) cuidam para que a qualidade e a confiabilidade sejam mantidas, e para que os laboratórios sejam certificados nas normas (ISO 9001; ISO 14001) precisam mostrar competência técnica, submetendo-se a credenciamento nesses órgãos (RIBANI et al., 2004).

A validação da metodologia analítica proposta foi obtida integrando-se parâmetros sugeridos pela literatura (INMETRO, 2003; BRITO et al., 2003; LEITE, 1998).

### **3.6.1 PARÂMETROS ANALÍTICOS PARA VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA**

A validação de Métodos Analíticos consiste em garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atende as exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Os parâmetros analíticos correntemente aplicados para validação de métodos analíticos de separação são: seletividade, linearidade e faixa linear de trabalho, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação (BRITO et al., 2003; INMETRO, 2003; LEITE, 1998).

#### **3.6.1.1 SELETIVIDADE**

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

A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão fatalmente comprometidas (RIBANI et al., 2004).

Muitas maneiras há de se avaliar a seletividade, como a utilização de detectores por Espectroscopia de Massas que comparam o espectro do pico obtido na separação com o de um padrão (arquivado em biblioteca) e utiliza isso para demonstrar que o pico cromatográfico é atribuído a um só componente (ANVISA, 2003). Outro modo usa a adição de padrão analítico (análises por Espectrometria de Absorção ou de Emissão Atômica) ou a comparação com padrão externo (BRITO et al., 2003).

Se a matriz sem o analito estiver disponível, a seletividade também poderá ser calculada utilizando-se os testes estatísticos F (Snedecor) de homogeneidade de variâncias e o

teste t (Student) de comparação de médias; se isso não ocorrer, a matriz poderá ser avaliada comparando-se as inclinações das curvas de adição de padrão (INMETRO, 2003).

### **3.6.1.2 LINEARIDADE**

Segundo a ANVISA, linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (curva analítica) e recomenda que a linearidade seja determinada pela análise de pelo menos 5 concentrações diferentes (ANVISA, 2003).

A linearidade pode ser observada a partir do método matemático de regressão linear, em que se calcula além dos coeficientes angular e linear, o coeficiente de correlação R, através dos pontos experimentais. Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de correlação (RIBANI, et al., 2004). A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual ou maior que 0,99 e para o INMETRO um valor acima de 0,90 já traduz um bom ajuste.

### **3.6.1.3 FAIXA LINEAR DE TRABALHO**

Independentemente da técnica instrumental utilizada, a relação linear, representada pela equação  $y = ax + b$ , tem validade apenas para certo intervalo de massa ou concentração da espécie medida (RIBANI et al., 2004). No limite inferior da faixa de concentração, os fatores limitantes são os valores do Limite de Detecção e Limite de Quantificação. Já no limite superior, os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do equipamento de medição (INMETRO, 2003).

O interregno entre os níveis inferior e superior de concentração do analito no qual foi demonstrado ser possível a determinação com a precisão, exatidão e linearidade exigidas, sob as condições especificadas para o ensaio, define a faixa linear de trabalho de um método de ensaio (INMETRO, 2003).

Para a ANVISA (2003) um intervalo entre 80% e 120% da concentração teórica para fármacos e medicamentos e de até 120% do limite máximo especificado para determinação de impurezas, são intervalos recomendáveis.

### 3.6.1.4 SENSIBILIDADE

A sensibilidade é definida como a capacidade do método em distinguir, com certo nível de confiança, duas concentrações próximas e na prática, ela é o coeficiente angular do gráfico analítico (reta) e é determinada simultaneamente com os testes de linearidade (BRITO et al., 2003; INMETRO, 2003).

Quando o método é sensível, qualquer diferença na concentração do analito, por menor que seja, gera grande variação no valor do sinal analítico medido e expresso a capacidade do procedimento analítico de causar variação no valor da propriedade monitorada ou medida, causada por pequena variação na concentração ou na quantidade do analito (BRITO et al., 2003).

### 3.6.1.5 PRECISÃO

Segundo Ribani e colaboradores (2004), a precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes repetidos de uma mesma amostra, de amostras semelhantes ou padrões sob condições definidas. É costume expressar-se a precisão como o desvio padrão, a variância ou o coeficiente de variação.

Pode-se expressar também a precisão pelo intervalo de confiança da média, que é uma faixa de valores no qual existe uma determinada probabilidade de se encontrar certo valor de uma variável e é calculada por:

$$\text{Intervalo de confiança da média} = \bar{x} \pm t_{n-1} \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Onde:  $t_{n-1}$  = valor crítico da distribuição de *Student* com n-1 graus de liberdade. O valor t é tabelado e apresenta valores para diferentes níveis de confiança (RIBANI et al., 2004).

Pode-se avaliar a precisão pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV) e são calculados pela expressão:

$$\text{RSD(\%)} \text{ ou } \text{CV(\%)} = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

Onde:  $s$  = desvio padrão das recuperações e  $x$  = média das recuperações (BRITO, et al., 2003; ANVISA, 2003; RIBANI et al., 2004).

A metodologia usada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, definem o valor máximo admitido. Em geral métodos que quantificam compostos em macro quantidades requerem um RSD de 1 a 2% e métodos de análise de traços um RSD de até 20% (RIBANI et al., 2004).

### **3.6.1.6 EXATIDÃO**

Define-se exatidão como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito convencionalmente como verdadeiro (INMETRO, 2003; Brito et al., 2003).

Considera-se, sempre, dentro de certos limites, a um dado nível de confiança, ou seja, surgindo associada a valores de precisão. Em análises com elevados níveis de concentração, tais limites são reduzidos, tornando-se mais amplos nas análises de traços (RIBANI et al., 2004).

A maioria dos métodos propostos para estudo de exatidão considera o uso de materiais de referência certificados (MRC) quando se comparam o método proposto com um de referência, quando se aplicam ensaios de recuperação na matriz e quando são elaborados estudos em colaboração (BRITO et al., 2003).

Esses MRC vêm acompanhados de um certificado do valor de concentração de cada substância e são utilizados quase sempre na validação de um método analítico. Esse certificado é usado na comparação de seu valor com os valores obtidos nas análises das replicatas, podendo-se usar nas comparações o erro relativo, o teste de hipóteses, índice  $z$  (Score) e erro normalizado (INMETRO, 2003).

Comparam-se os resultados obtidos pelo método em desenvolvimento e os resultados conseguidos por meio de um método de referência e avaliam-se a proximidade entre os resultados obtidos pelos dois métodos, testando-se o grau de exatidão do método proposto em relação ao de referência (RIBANI et al., 2004).

Para os trabalhos entre laboratórios avaliam-se amostras preparadas homogeneamente e testa-se o método aplicando-se as condições normais de trabalho (INMETRO, 2003) contando-se com o número mínimo de oito laboratórios aplicando-se a análise de variância que checam a existência de diferenças representativas entre os valores obtidos pelos laboratórios envolvidos (BRITO et al., 2003).

Define-se recuperação como a proporção da quantidade da substância desejada, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que se extrai, e seja passível de quantificação. Esse ensaio de recuperação tem sido amplamente usado nas validações de processos analíticos (RIBANI et al., 2004).

Na recuperação, usa-se a fortificação da amostra que se consegue adicionando-se soluções com diferentes concentrações do analito de interesse, para em seguida, proceder-se a determinação da concentração do analito adicionado, calculando-se então, a porcentagem da quantidade recuperada pelo método, por meio da fórmula a seguir (BRITO et al., 2003).

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

Onde Rec.(%) = Recuperação

Diversos componentes da matriz podem interferir na separação, detecção ou na quantificação da substância, portanto os efeitos dos componentes da matriz devem ser investigados (RIBANI et al., 2004).

A dispersão dos resultados cresce com a diminuição da concentração, e a recuperação pode variar significativamente com a oscilação das concentrações, quando muito altas ou muito baixas. Deve-se avaliar a recuperação na faixa de concentração esperada para o composto de interesse e isso se consegue com a adição da substância no mínimo em três diferentes níveis de concentrações, por exemplo, próximo ao limite de quantificação (LQ), próximo à concentração máxima permitida pelo método em teste e em uma concentração próxima à média da faixa de uso do método (RIBANI et al., 2004). A ANVISA (2003) estabelece um intervalo linear de três concentrações em triplicatas na faixa baixa, média e alta, gerando um número mínimo de nove determinações e fixa os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos entre 70 e 120%, com precisão de até  $\pm 20\%$ . Ribani e colaboradores (2004), considerando a complexidade da análise e da amostra, aumentam esse valor, que pode chegar a ser de 50 a 120%, com precisão de até  $\pm 15\%$ .

O teste de hipóteses também é muito usado na determinação da exatidão e estabelece como hipótese nula (H0) Rec. = 100% e como hipótese alternativa (H1) Rec.  $\neq$  100 e aplica o teste t com 95 ou 99% de confiança e n-1 graus de liberdade. Comparam-se os valores de t tabelados com os calculados pela equação a seguir e sendo esse o valor de t maior que o valor calculado, aceita-se a hipótese nula, significando que não há diferenças representativas entre valor encontrado e o valor tido como verdadeiro (BRITO et al., 2002).

$$t_{\text{calculado}} = \frac{\overline{\text{Rec}} - 100}{\frac{s}{\sqrt{n}}}$$

Onde:  $\overline{\text{Rec}}$  é a recuperação média;  $s$  é o desvio padrão das recuperações e  $n$  é o número de replicatas.

### 3.6.1.7 LIMITE DE DETECÇÃO (LD)

Segundo a ANVISA (2003), Limite de Detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado e não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. Calcula-se o LD de três modos diferentes, usando-se o método visual, ou o método relação sinal-ruído, ou ainda o método em parâmetros da curva analítica.

No primeiro método (visual), determina-se o LD utilizando-se a matriz com adição de concentrações conhecidas da substância de interesse, distinguindo-se entre ruído e sinal analítico pela visualização da menor concentração visível (detectável) (RIBANI et al., 2004).

No segundo método (relação sinal-ruído), que é aplicável em procedimentos analíticos que mostram o ruído da linha base, determina-se a relação sinal-ruído e compara-se com a medição dos sinais de amostras em baixas concentrações conhecidas do composto de interesse na matriz e uma matriz isenta do composto de interesse (branco) destas amostras. Fica então estabelecida uma concentração mínima na qual a substância pode ser facilmente detectada (RIBANI et al., 2004). A ANVISA (2003) sugere uma relação sinal-ruído de 3:1; já o INMETRO (2003) recomenda uma relação de três a cinco vezes maiores que o sinal do ruído.

No terceiro método, calcula-se o LD por meio de parâmetros da curva analítica, conforme segue:

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

Onde:  $s$  é a estimativa do desvio padrão da resposta, podendo 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 ou coeficiente angular da curva analítica.

### 3.6.1.8 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)

A ANVISA (2003) define Limite de Quantificação (LQ), que é um parâmetro determinado para ensaios de quantificação, como a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob condições experimentais pré-estabelecidas e pode ser expresso como uma concentração, registrando-se a precisão e a exatidão determinadas.

Os critérios utilizados para o LD valem para o LQ, utilizando a relação 10:1, ou seja, calcula-se o LQ utilizando-se quaisquer dos métodos, visual, de 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, pela equação:

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

Esses limites LD e LQ podem ser afetados pelas condições cromatográficas. Picos cromatográficos maiores aumentam a relação sinal-ruído, causando LD e LQ menores, porém costuma-se contornar esse problema calculando-se esses limites por meio dos parâmetros da curva analítica, que é estatisticamente mais confiável (RIBANI et al., 2004).

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 MATERIAIS**

#### **4.1.1 PADRÕES, REAGENTES E SOLUÇÕES**

##### **4.1.1.1 SOLUÇÕES PADRÃO DE BFA**

A solução estoque de BFA (Aldrich, EUA, 95%) na concentração de  $102 \text{ mg L}^{-1}$  e soluções de trabalho de BFA na concentração de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  foram preparadas em etanol (Vetec, Brasil, 95%).

##### **4.1.1.2 SOLUÇÃO DE ÁGUA/METANOL**

A solução de água/metanol na proporção 9/1 (v/v) com água ultra-purificada (Elga, Analítica, condutividade  $18,2 \text{ m}\Omega \text{ cm}^{-1}$ ) e metanol (Dinâmica, Brasil, HPLC/UV).

##### **4.1.1.3 DEMAIS REAGENTES**

Foram utilizados no processo acetato de etila (Mallinckrodt, México, HPLC) e hexano (Vetec, Brasil, 95% para análise de pesticida).

Para o processo de derivação foi utilizado anidrido trifluoracético, TFAA, (Aldrich, EUA,  $\geq 99\%$ ).

### **4.2 LIMPEZA DE VIDRARIA**

A vidraria foi lavada utilizando o detergente alcalino Extran (Merck, Brasil) a 2% em banho de ultrassom (Spencer, Unique, Brasil) por 15 min, exceto a vidraria volumétrica que foi deixada imersa nesta solução durante uma noite. Em seguida, foi enxaguada com água de torneira, água destilada, água deionizada e seca ao ar. Os frascos foram secados em estufa a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  por 12h.

### 4.3 METODOLOGIA ANALÍTICA

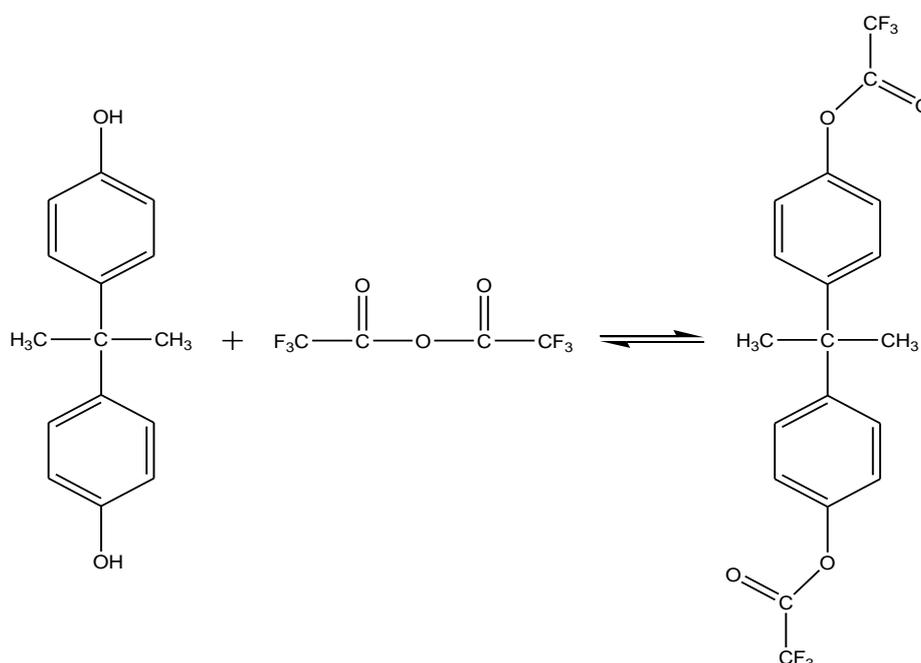
Neste estudo um método analítico para determinação de BFA em água mineral foi desenvolvido, utilizando-se Extração Fase Sólida (EFS) e análise por Cromatografia em fase gasosa acoplada à detector por captura de elétrons (CG-DCE).

#### 4.3.1 EXTRAÇÃO E DERIVAÇÃO

O volume de amostra tomado foi de 500 mL para cada ensaio.

Foi realizada reação de derivação para aumento de sensibilidade, proporcionando melhor visualização do analito frente à coluna utilizada conforme proposto por Costa (2008).

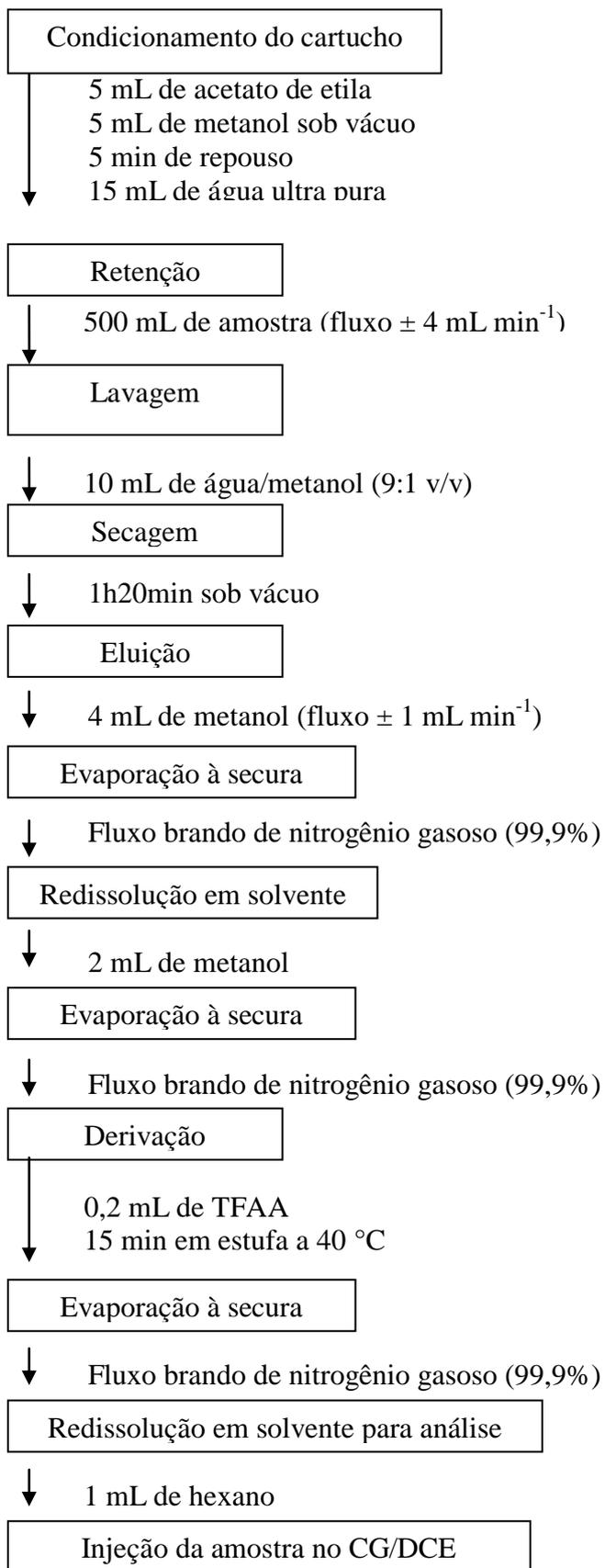
A Figura 2 mostra a reação de derivação do BFA com TFAA.



**Figura 2.** Reação de derivação do BFA com TFAA.

Para a EFS foram utilizados cartuchos STRATA-X de 200 mg x 3 mL (Phenomenex, EUA) em um sistema de extração de 12 posições da Supelco (EUA) acoplado a bomba de vácuo da Tecnal (Brasil) com pressão de 20 mmHg.

As amostras foram extraídas e derivadas conforme fluxograma abaixo apresentado seguindo modificação de metodologia proposta por Leandro (2006).



### 4.3.2 BRANCO E TESTEMUNHA

Os ensaios de branco consistiram em realizar todo o procedimento de extração sem a passagem de amostra pelo sistema de extração. Para tal, foi seguido todo o roteiro acima proposto e posterior injeção no cromatógrafo a título de isentar os reagentes utilizados de possíveis interferências na análise do BFA.

Para os ensaios de testemunha foi utilizado como amostra água isenta de BFA e todos os demais reagentes descritos, aplicados ao método proposto e a título de isentar a matriz de possíveis interferências na análise do BFA.

### 4.3.3 AMOSTRAS DE ÁGUA MINERAL

O material analisado consistiu de amostras de água mineral, consumida pela população, adquiridas no comércio local (Campo Grande/MS), não obedecendo a um critério estatístico, mas sim atendendo a uma necessidade de aplicação da metodologia desenvolvida para possibilitar o estudo da presença ou não de BFA nas amostras.

Foram analisadas quatro amostras de água mineral, usando como critérios as diferenças de embalagens (PET, PVC, PP, Vidro) a fim de se obterem dados referentes às possíveis variações na concentração de BFA nas amostras.

As amostras nas quais o método desenvolvido foi aplicado encontram-se descritas na Tabela 3.

**Tabela 3.** Descrição das amostras reais de água mineral

| <b>Amostra</b> | <b>Tipo</b>   | <b>Embalagem</b> | <b>Volume</b> |
|----------------|---|------------------|---------------|
| 1              | Água mineral natural                                    | PET              | 1,50 L        |
| 2              | Água mineral natural                                    | PVC              | 1,50 L        |
| 3              | Água mineral natural                                    | PP               | 310 mL        |
| 4              | Água mineral natural Reforçada com gás da mesma fonte * | Vidro            | 330 mL        |

\*Submetida a 60 min em ultrassom (Spencer, Unique, Brasil) para degaseificação

Não se executou procedimento algum para conservação das amostras, que foram retiradas dos seus acondicionamentos e submetidas ao procedimento analítico.

#### 4.4 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

As análises foram efetuadas em Cromatógrafo a Gás com Detector por Captura de Elétrons CP-3800 (Varian), equipado com uma coluna capilar Wcot de sílica fundida, CP-Sil 13CB (50 m x 0,32 mm x 0,4  $\mu\text{m}$ ) da Varian. As condições cromatográficas estão descritas na Tabela 4.

**Tabela 4.** Condições cromatográficas do método analítico

|   |   |
|---|---|
| Injetor ( $^{\circ}\text{C}$ )                          | 270   |
| Detector ( $^{\circ}\text{C}$ )                         | 280   |
| Coluna ( $^{\circ}\text{C}$ )                           | Inicial: 120 (2 min)                        |
|   | 120 – 210 (15 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ) |
|   | 210-280 (10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ )   |
|   | Final: 280 (5 min)                          |
| Pressão na coluna (psi)                                 | 12.3  |
| Vazão do gás de Arraste ( $\text{mL min}^{-1}$ )        | 2.1   |
| Vazão do gás de <i>make-up</i> ( $\text{mL min}^{-1}$ ) | 30  |
| Tempo de análise (min)                                  | 20  |
| Modo de injeção   | sem divisão ( <i>splitless</i> )            |
| Volume de injeção                                       | 1 $\mu\text{L}$                             |
| Gás de arraste  | Hélio 5.0 analítico (White Martins)         |
| Gás de <i>make-up</i>                                   | Nitrogênio 4.6 (White Martins)              |

#### 4.5 LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

O limite de detecção (LD) foi determinado através da relação sinal:ruído da linha de base. Para isso foram preparadas soluções padrões que foram injetadas até se obter um sinal referente aos analitos com uma altura média igual a três vezes a altura média referente ao ruído.

Igual procedimento foi utilizado na determinação do LQ, porém, para a sua determinação (LQ) utilizou-se uma relação sinal:ruído de 10:1.

#### **4.6 CURVA ANALÍTICA PARA O BFA DERIVADO COM TFAA**

Foram preparadas e analisadas, em triplicatas, soluções padrão nas concentrações de 25, 75, 125, 175 e 250 ng mL<sup>-1</sup> para elaboração da curva analítica utilizando-se o BFA derivado com TFAA.

#### **4.7 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA**

Para o estudo de recuperação, alíquotas de 500 mL das amostras, em triplicatas, foram fortificadas com 25, 75 e 125 ng de BFA representando 1LQ, 3LQ e 5LQ.

O procedimento analítico também foi realizado na amostra testemunha para assegurar-se da isenção do analito na matriz.

As amostras fortificadas foram deixadas em repouso por um período de 30 minutos para depois serem submetidas ao procedimento analítico.

#### **4.8 LINEARIDADE E FAIXA LINEAR DE TRABALHO**

Adotou-se a faixa de 1 a 10 LQ dos compostos estudados. Volumes pré-determinados de padrões de BFA (concentrações conhecidas) foram adicionados para obterem-se amostras com as concentrações desejadas.

#### **4.9 ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO**

Ensaios de recuperação foram utilizados para verificarem-se a precisão e exatidão do método, haja vista que estes ensaios atendem a todos os parâmetros necessários para a avaliação destas variáveis.

A fórmula a seguir foi utilizada para o cálculo das recuperações, Rec.(%).

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

valor obtido= obtido pela injeção da amostra fortificada  
valor real= obtido pela injeção do padrão

E os coeficientes de variação CV(%) foram calculados por meio da fórmula.

$$CV(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

s = desvio padrão das recuperações

$\bar{x}$  = média das recuperações

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

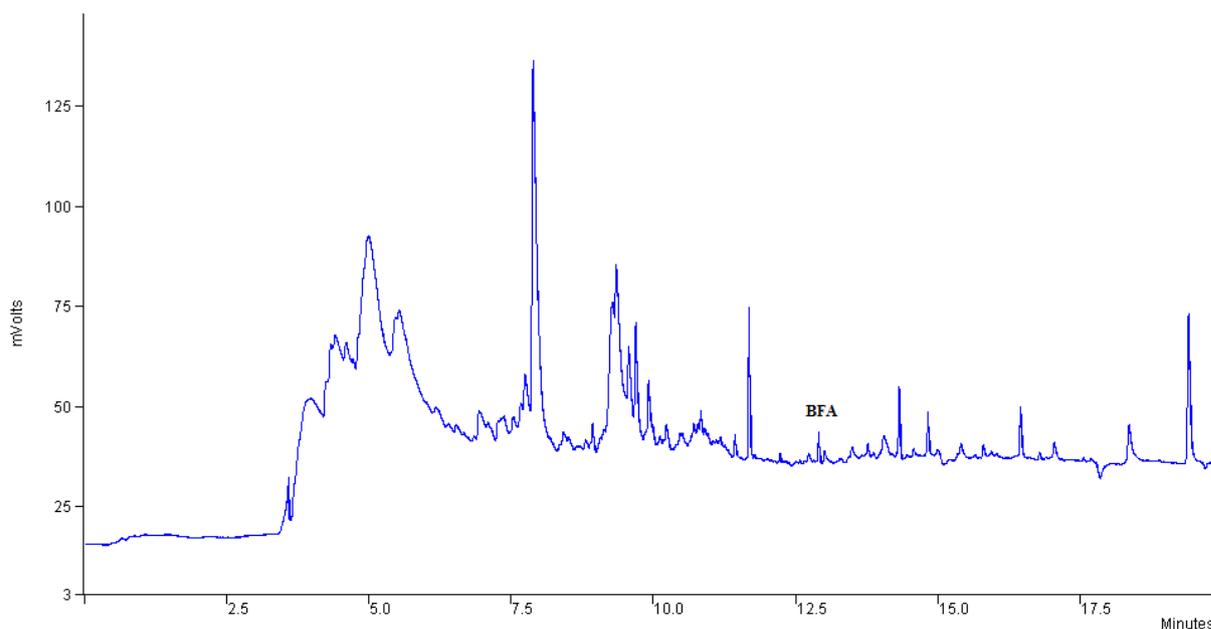
Os valores encontrados para LD e LQ para o BFA derivado com TFAA estão relacionados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Limite de detecção e limite de quantificação

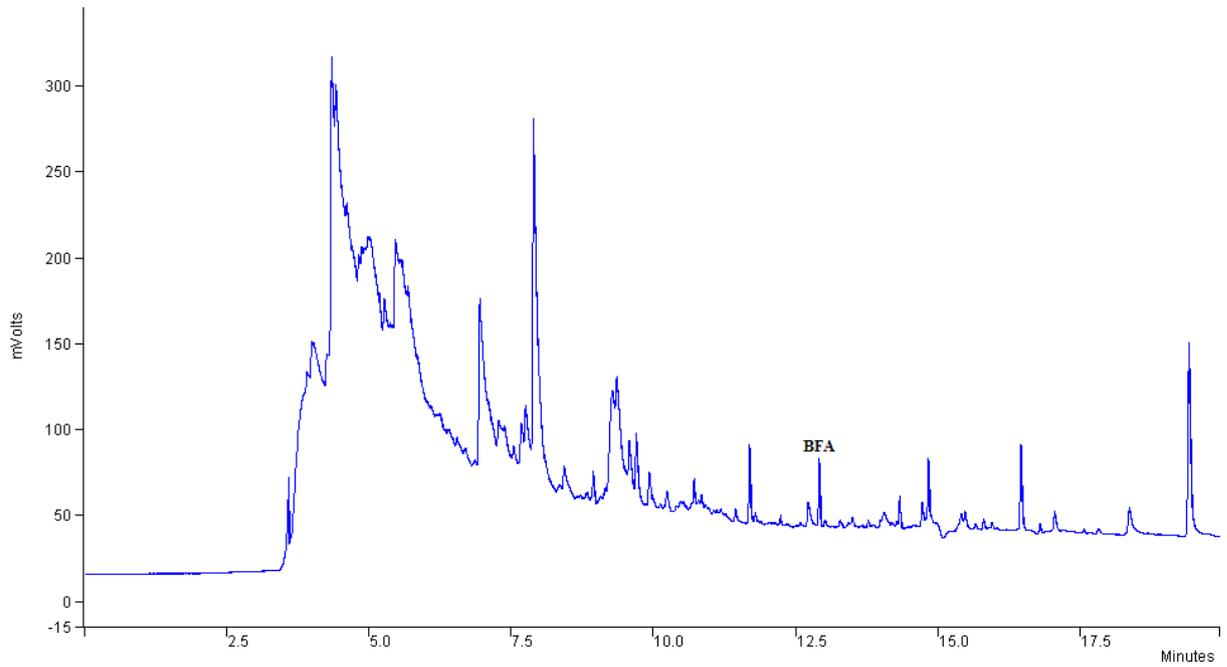
| BFA         | LD (ng mL <sup>-1</sup> ) | LQ (ng mL <sup>-1</sup> ) |
|-------------|---------------------------|---------------------------|
| Equipamento | 7,5                       | 25                        |
| Método      | 0,015                     | 0,05                      |

### 5.2 CURVA ANALÍTICA PARA O BFA DERIVADO COM TFAA

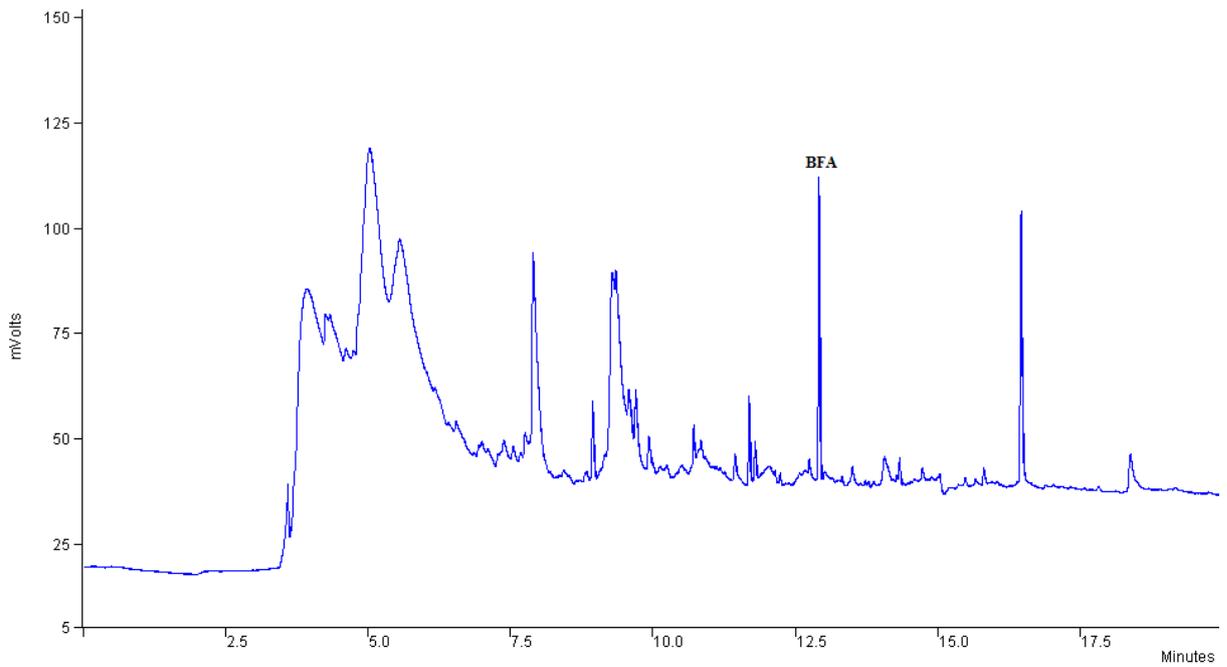
A seguir são apresentados exemplos dos cromatogramas obtidos nas concentrações utilizadas para a construção da curva analítica.



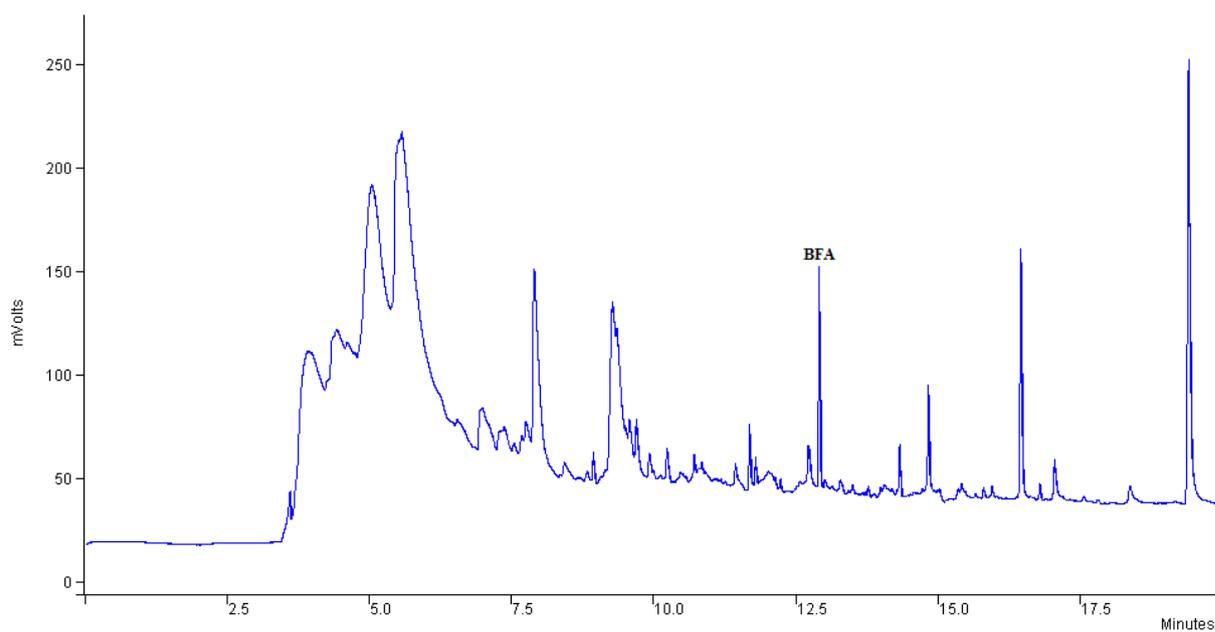
**Figura 3.** Cromatograma obtido pela injeção de 1,0  $\mu$ L de uma solução de BFA (25 ng mL<sup>-1</sup>) derivado com TFAA.



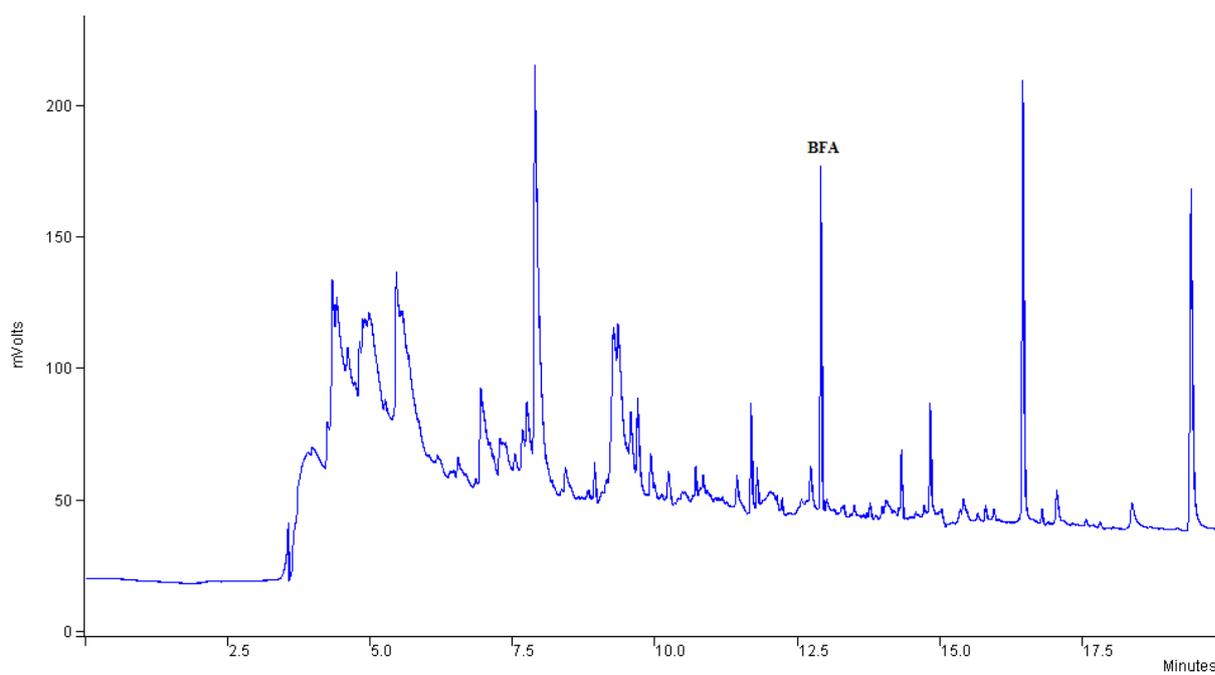
**Figura 4.** Cromatograma obtido pela injeção de 1,0  $\mu\text{L}$  de uma solução de BFA ( $75 \text{ ng mL}^{-1}$ ) derivado com TFAA.



**Figura 5.** Cromatograma obtido pela injeção de 1,0  $\mu\text{L}$  de uma solução de BFA ( $125 \text{ ng mL}^{-1}$ ) derivado com TFAA.

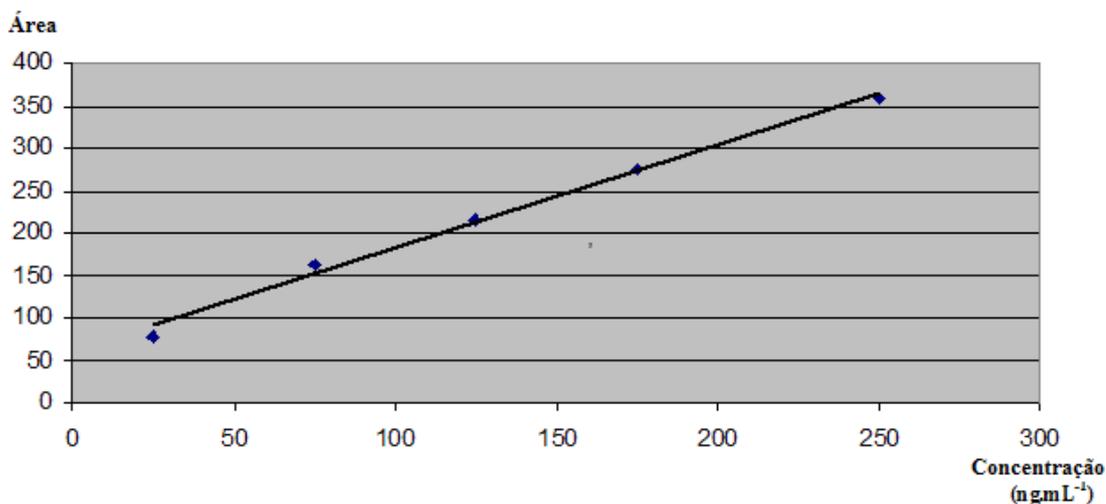


**Figura 6.** Cromatograma obtido pela injeção de 1,0  $\mu\text{L}$  de uma solução de BFA ( $175 \text{ ng mL}^{-1}$ ) derivado com TFAA.



**Figura 7.** Cromatograma obtido pela injeção de 1,0  $\mu\text{L}$  de uma solução de BFA ( $250 \text{ ng mL}^{-1}$ ) derivado com TFAA.

A Figura 8 mostra a curva analítica do BFA derivado com TFAA.



**Figura 8.** Curva analítica do BFA derivado com TFAA.

### 5.2.1 EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO

A equação da reta e o coeficiente de correlação (R) obtido estão apresentados na Tabela 6.

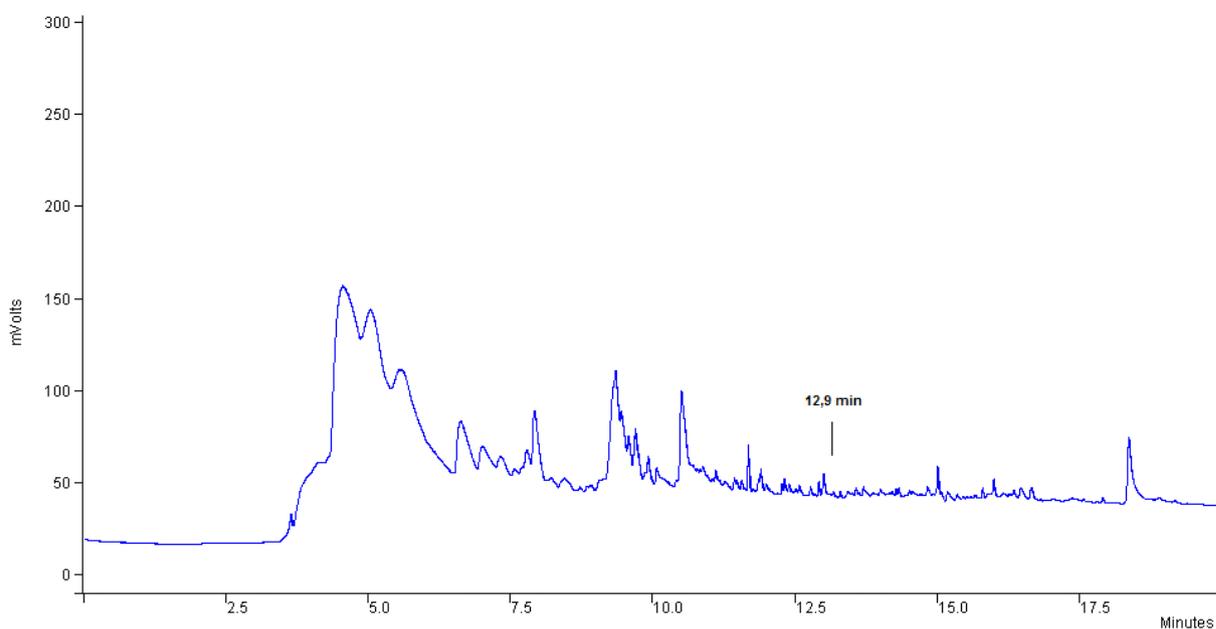
**Tabela 6.** Equação da reta e coeficiente de correlação.

| Curva analítica       | Equação da reta<br>( $y = a + bx$ ) | Coeficiente de correlação (R) |
|-----------------------|-------------------------------------|-------------------------------|
| BFA derivado com TFAA | $y = 60,284 + 1,216x$               | 0,9928                        |

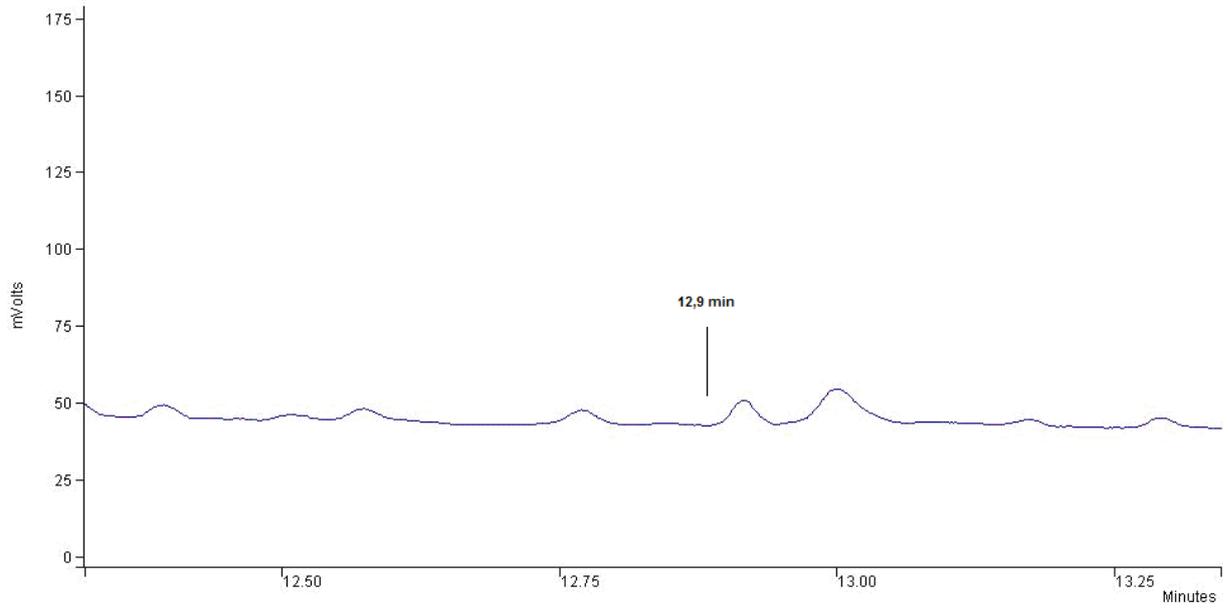
## 5.3 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA

### 5.3.1 SELETIVIDADE

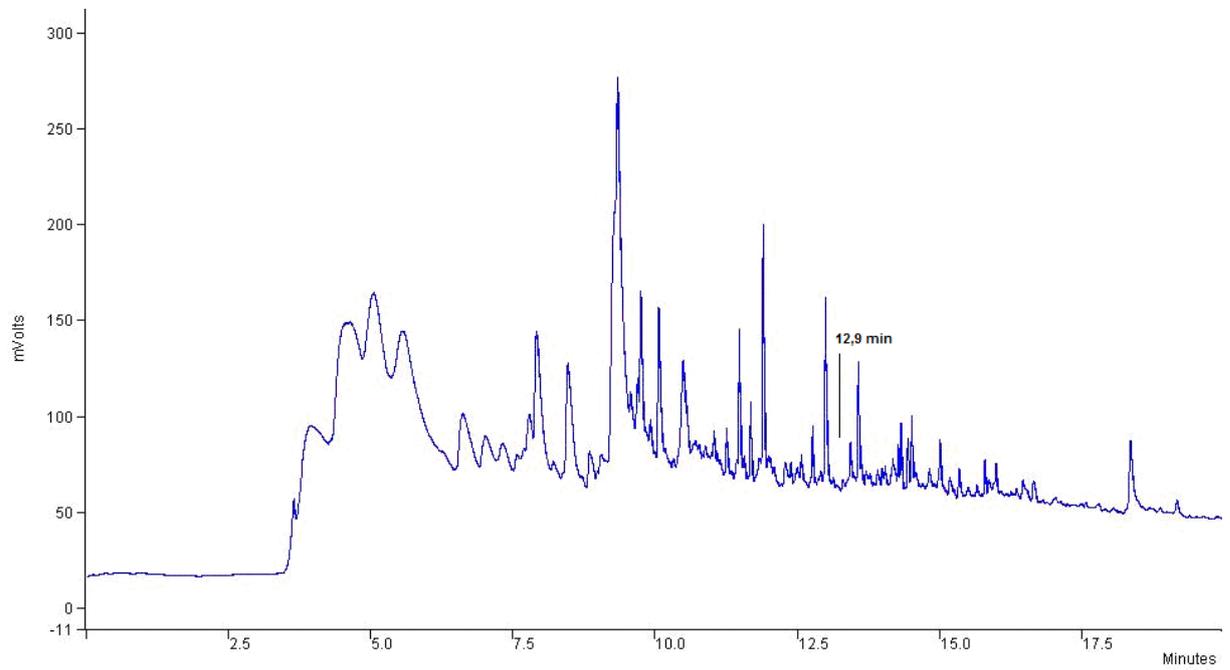
Evidencia-se na análise dos cromatogramas das amostras do branco, da testemunha e do padrão BFA, apresentadas nas figuras 9 a 12, que no tempo de retenção (12,9 min) não foram registrados picos cromatográficos iguais ou próximos ao do BFA, indicando que não houve interferências da matriz no padrão, portanto, garantindo que o método é especialmente seletivo.



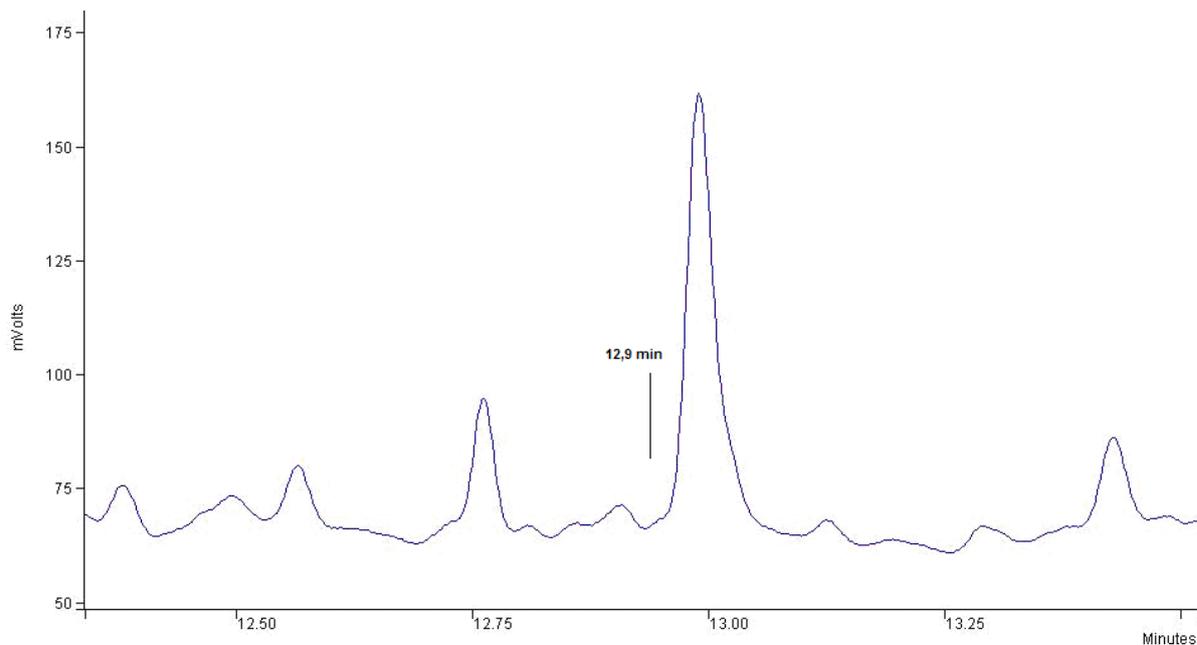
**Figura 9.** Cromatograma obtido pela injeção de 1,0  $\mu$ L do branco.



**Figura 10.** Cromatograma ampliado obtido pela injeção de 1,0  $\mu\text{L}$  do branco.



**Figura 11.** Cromatograma obtido pela injeção de 1,0  $\mu\text{L}$  da amostra testemunha.



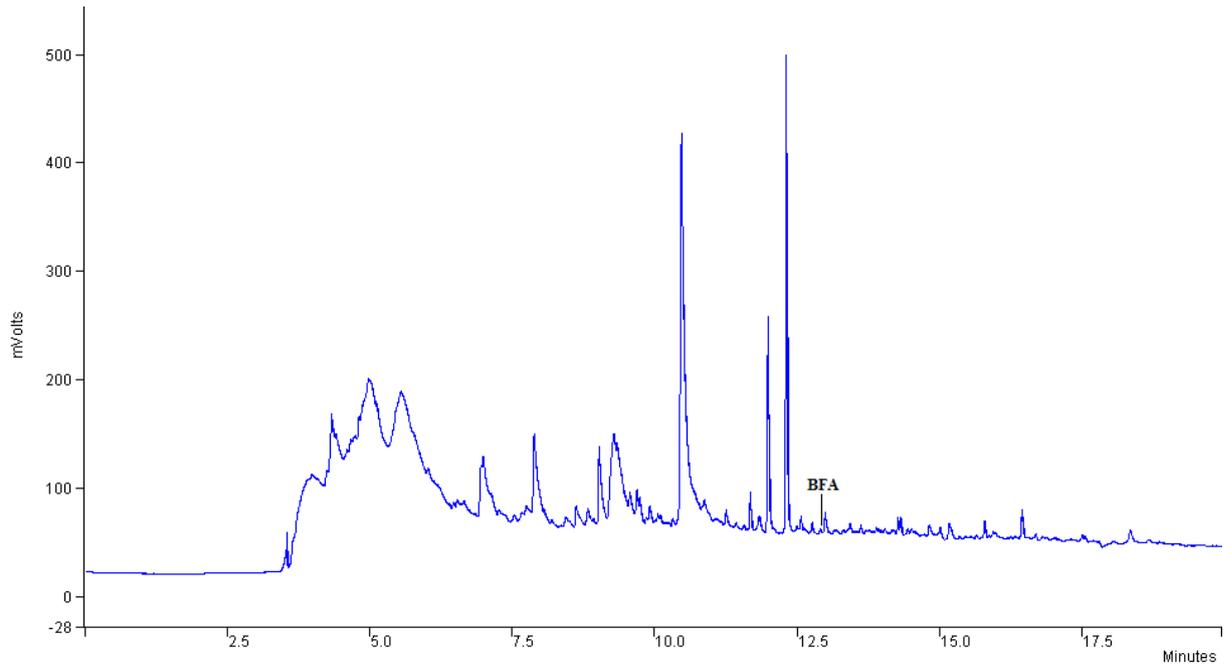
**Figura 12.** Cromatograma ampliado obtido pela injeção de 1,0  $\mu\text{L}$  da amostra testemunha.

### 5.3.2 LINEARIDADE E FAIXA LINEAR DE TRABALHO

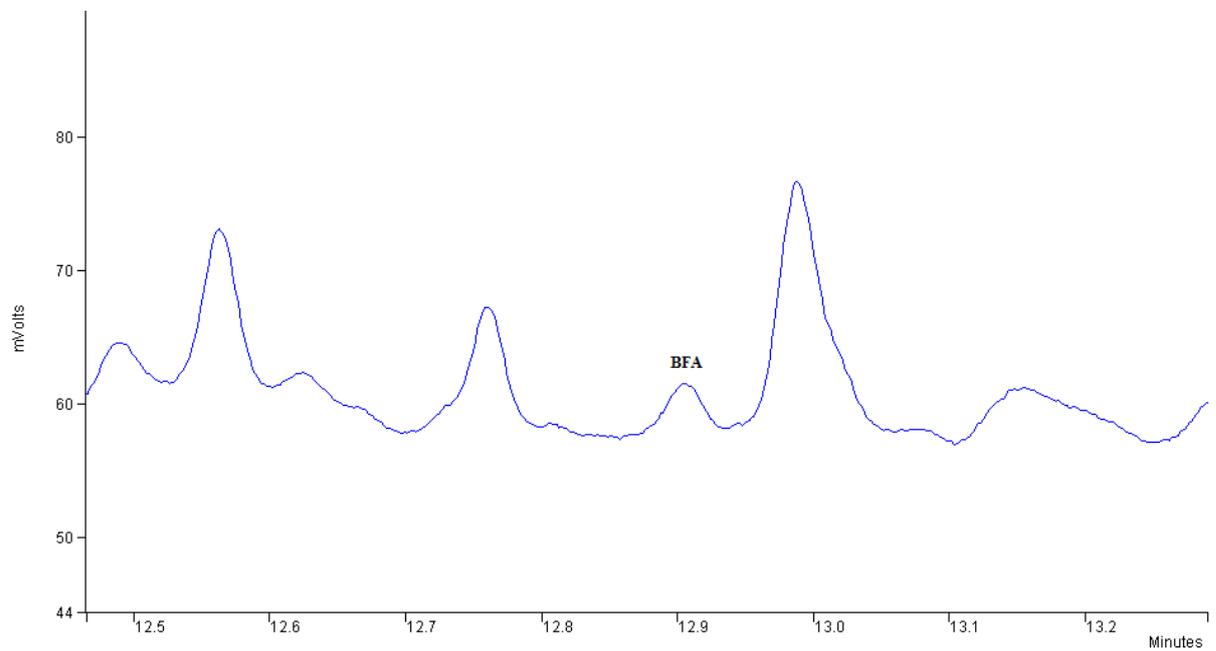
A Tabela 6 apresentada anteriormente mostra a boa linearidade da curva, exibindo o Coeficiente de Correlação (R) maior que 0,99 atendendo assim satisfatoriamente às recomendações da ANVISA (2003).

### 5.3.3 ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO

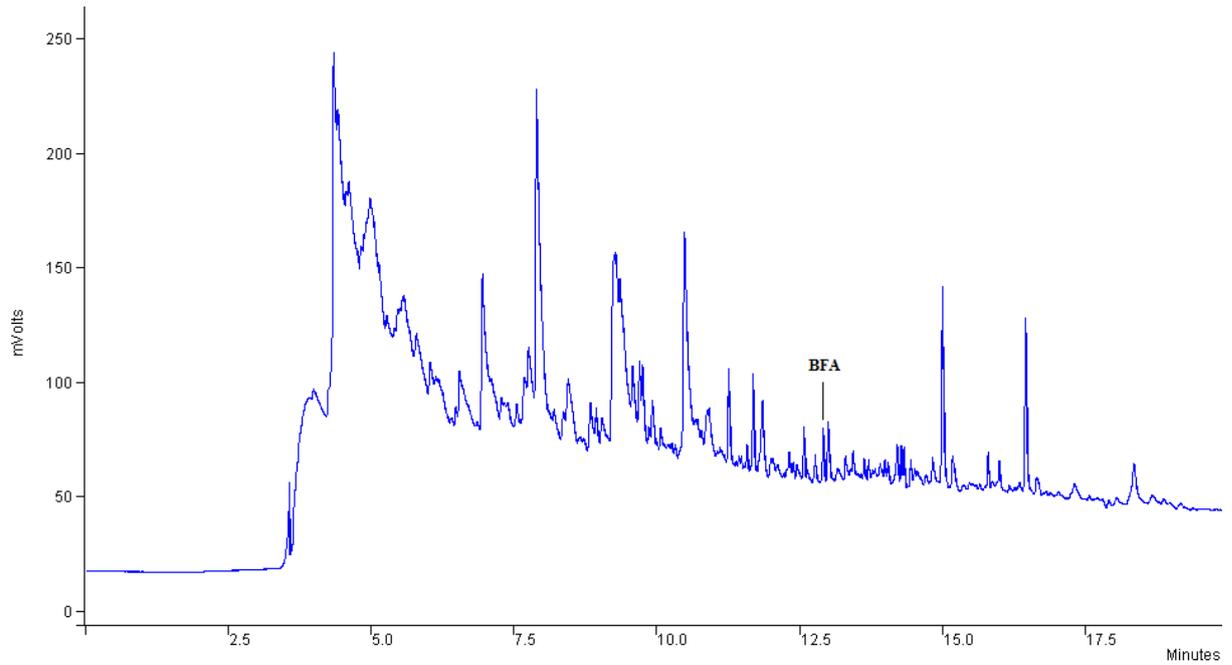
As análises cromatográficas apresentaram excelentes resultados, mostrados nas Figuras 13 a 18.



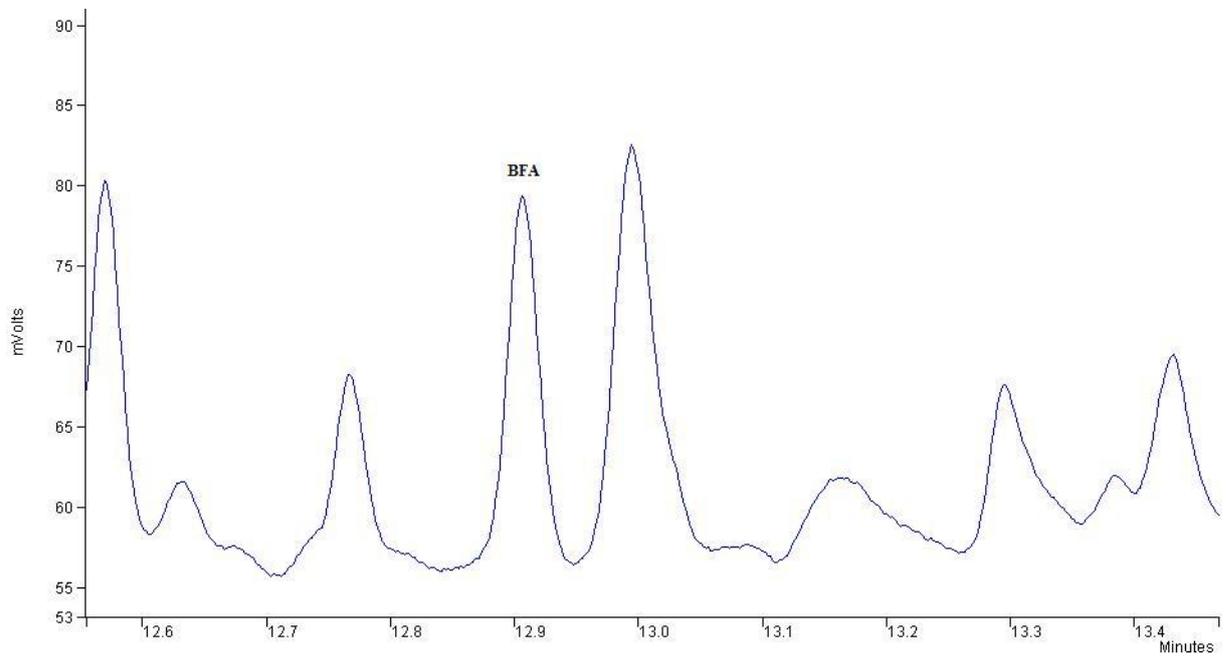
**Figura 13.** Cromatograma obtido dos ensaios de recuperação de uma amostra fortificada com  $25 \text{ ng mL}^{-1}$  (1LQ) de BFA.



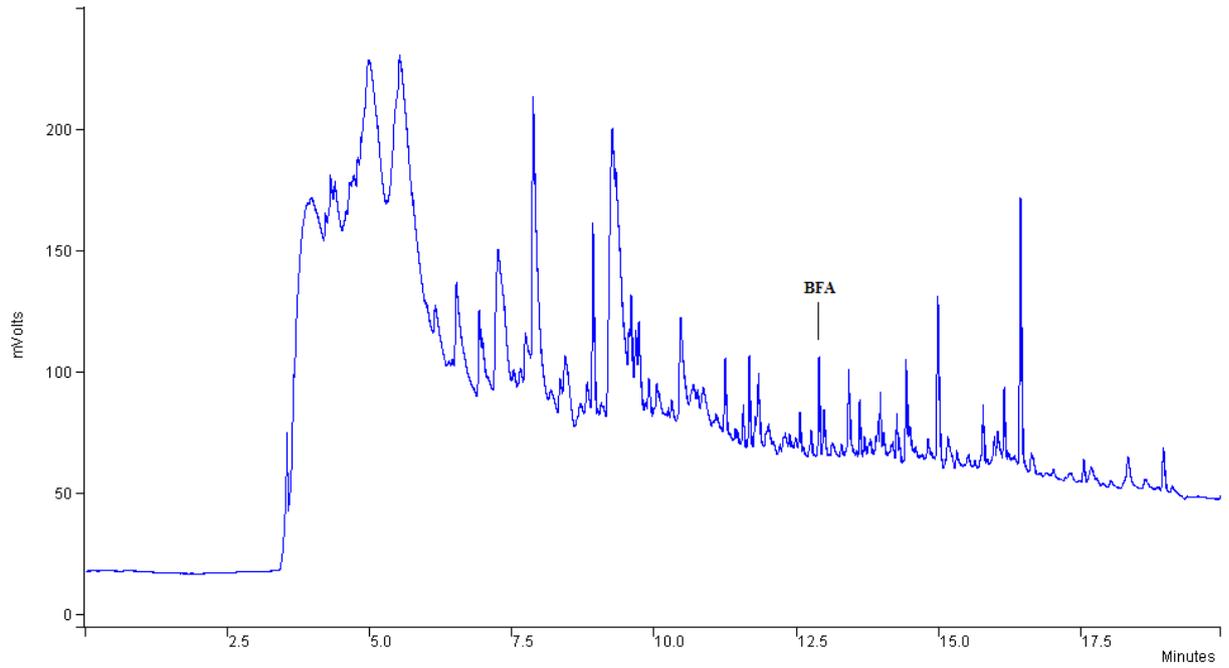
**Figura 14.** Cromatograma ampliado obtido dos ensaios de recuperação de uma amostra fortificada com  $25 \text{ ng mL}^{-1}$  (1LQ) de BFA.



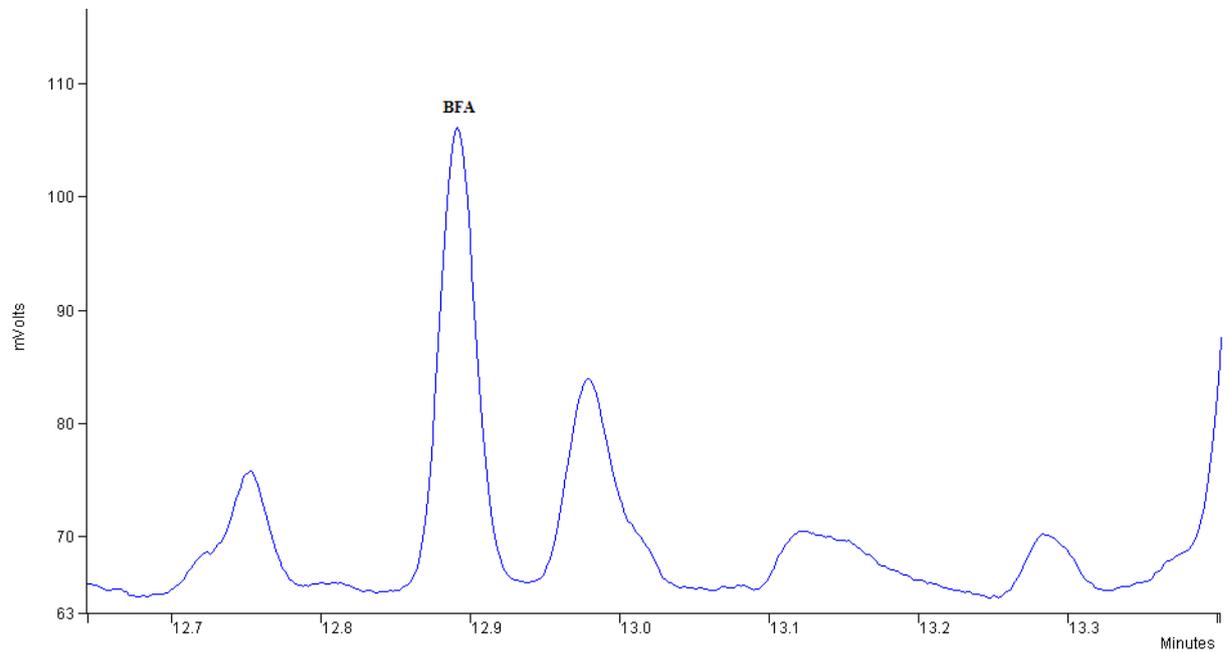
**Figura 15.** Cromatograma obtido dos ensaios de recuperação de uma amostra fortificada com  $75 \text{ ng mL}^{-1}$  (3LQ) de BFA.



**Figura 16.** Cromatograma ampliado obtido dos ensaios de recuperação de uma amostra fortificada com  $75 \text{ ng mL}^{-1}$  (3LQ) de BFA.



**Figura 17.** Cromatograma obtido dos ensaios de recuperação de uma amostra fortificada com  $125 \text{ ng mL}^{-1}$  (5LQ) de BFA.



**Figura 18.** Cromatograma ampliado obtido dos ensaios de recuperação de uma amostra fortificada com  $125 \text{ ng mL}^{-1}$  (5LQ) de BFA.

As amostras fortificadas foram submetidas ao procedimento analítico (em triplicata) com derivação com TFAA e os dados concernentes às análises são apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7.** Dados obtidos dos ensaios de recuperação referentes à análise de BFA

| <b>Limite de Quantificação</b> | <b>Concentração (ng mL<sup>-1</sup>)</b> | <b>Desvio Padrão (s)</b> | <b>CV (%)</b> | <b>Recuperação (%)</b> |
|--------------------------------|--|--------------------------|---------------|------------------------|
| 1LQ                            | 25                                       | 13,6                     | 15,5          | 88                     |
| 3LQ                            | 75                                       | 8,5                      | 10,9          | 79                     |
| 5LQ                            | 125                                      | 14,0                     | 13,2          | 106                    |

#### **5.3.4 EXATIDÃO**

Avalia-se a exatidão observando-se a porcentagem de recuperação. Pelos dados da Tabela 7, nota-se que o método é considerado exato, já que as recuperações de todas as amostras estão dentro da faixa (70 – 120%) estabelecida pela literatura na área de análise de resíduos (BRITO et al., 2003; ANVISA, 2003).

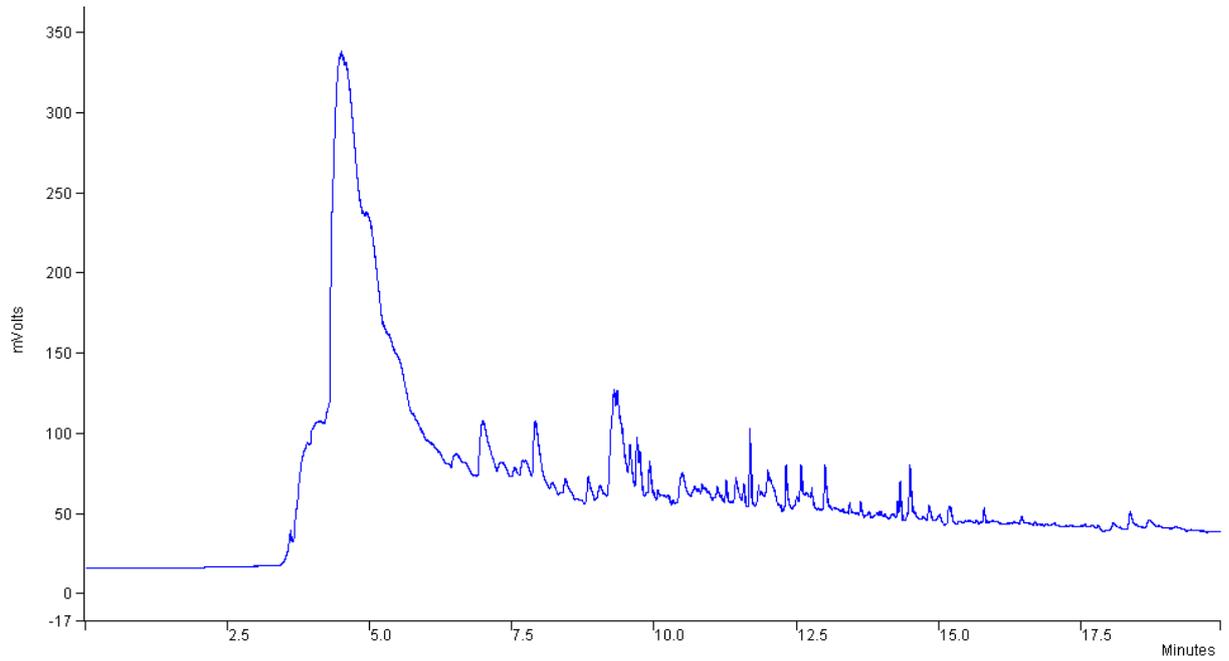
#### **5.3.5 PRECISÃO**

Avaliou-se a precisão analisando-se os coeficientes de variação, CV(%). Esses valores de CV(%) sofreram variação de 15,5% para amostras fortificadas com 1LQ de BFA; de 10,9% para amostras fortificadas com 3LQ de BFA e de 13,2% para amostras fortificadas com 5LQ; ficando com a média de variação de 13,2%, abaixo do limite recomendado pela literatura, que é de até 20% (ANVISA, 2003; RIBANI et al., 2004), indicando que o método é preciso.

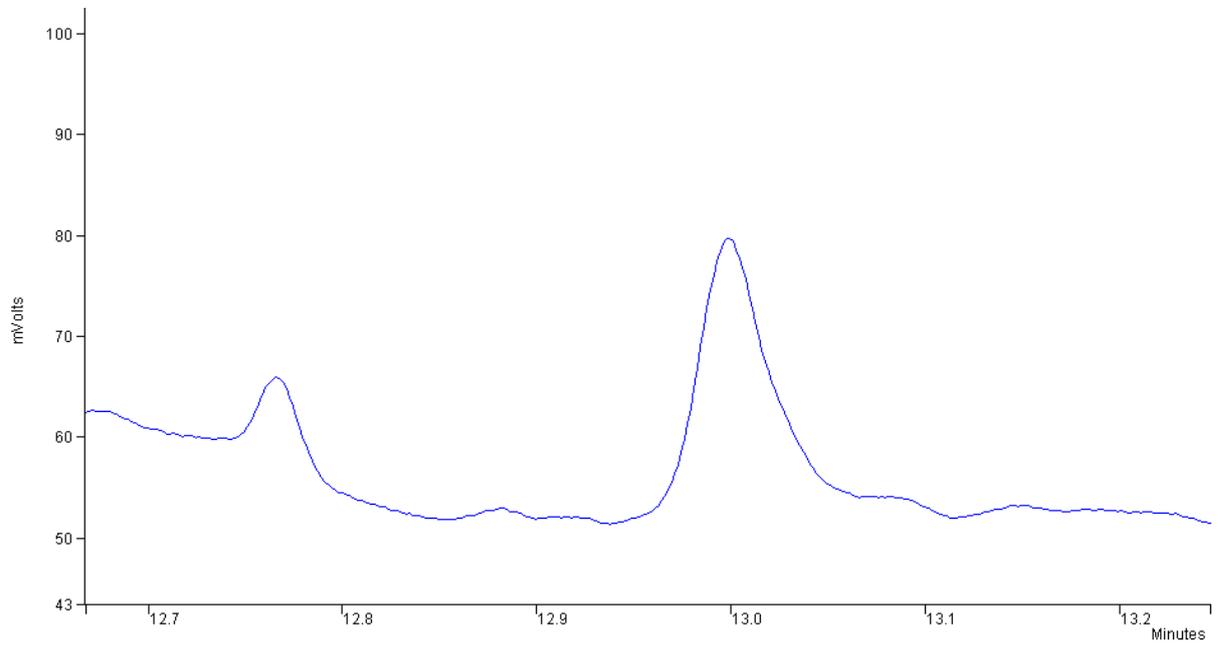
#### **5.3.6 APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS DE ÁGUA MINERAL**

O método proposto foi aplicado em quatro amostras de água mineral.

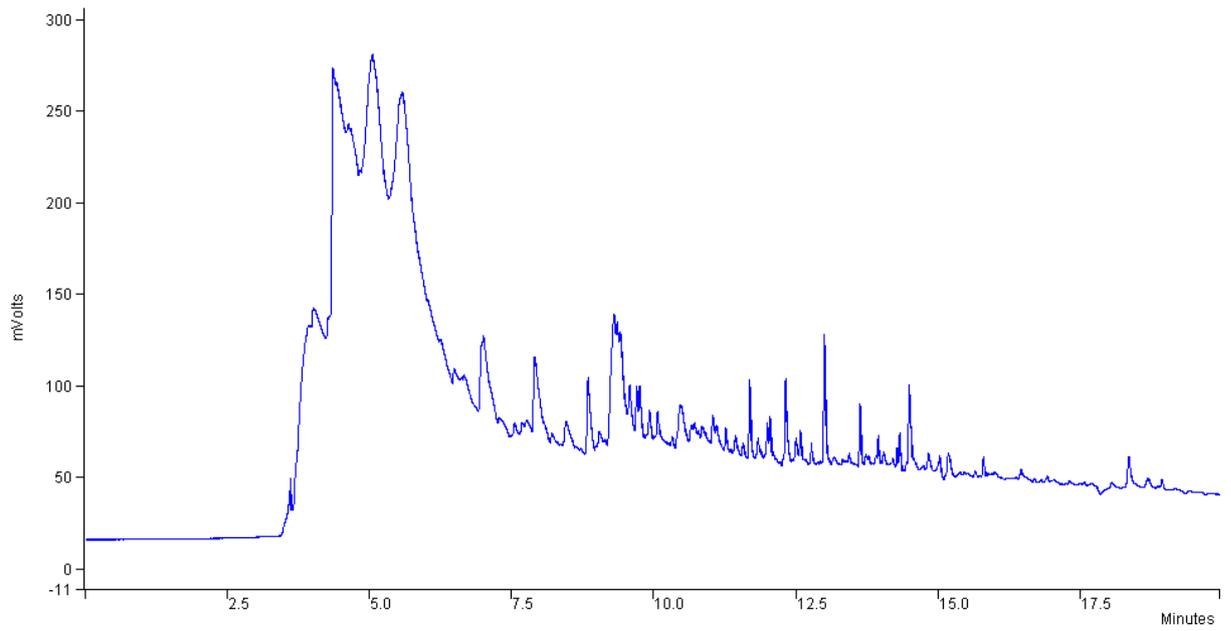
Os cromatogramas são apresentados nas Figuras 19 a 27.



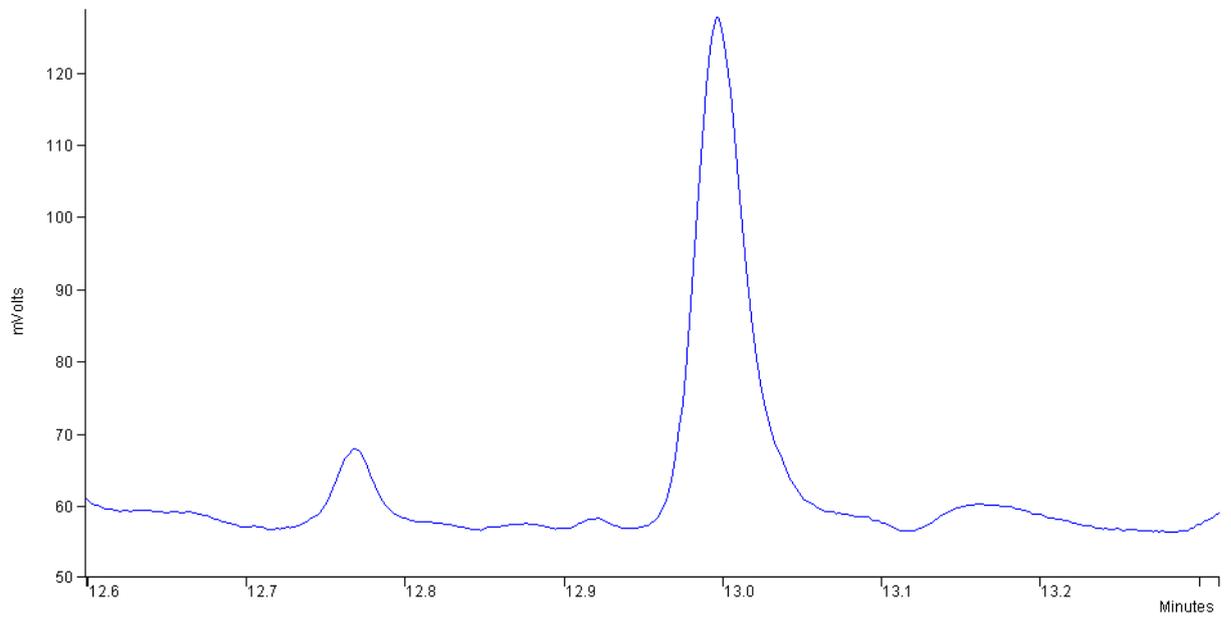
**Figura 19.** Cromatograma obtido da análise da amostra 1.



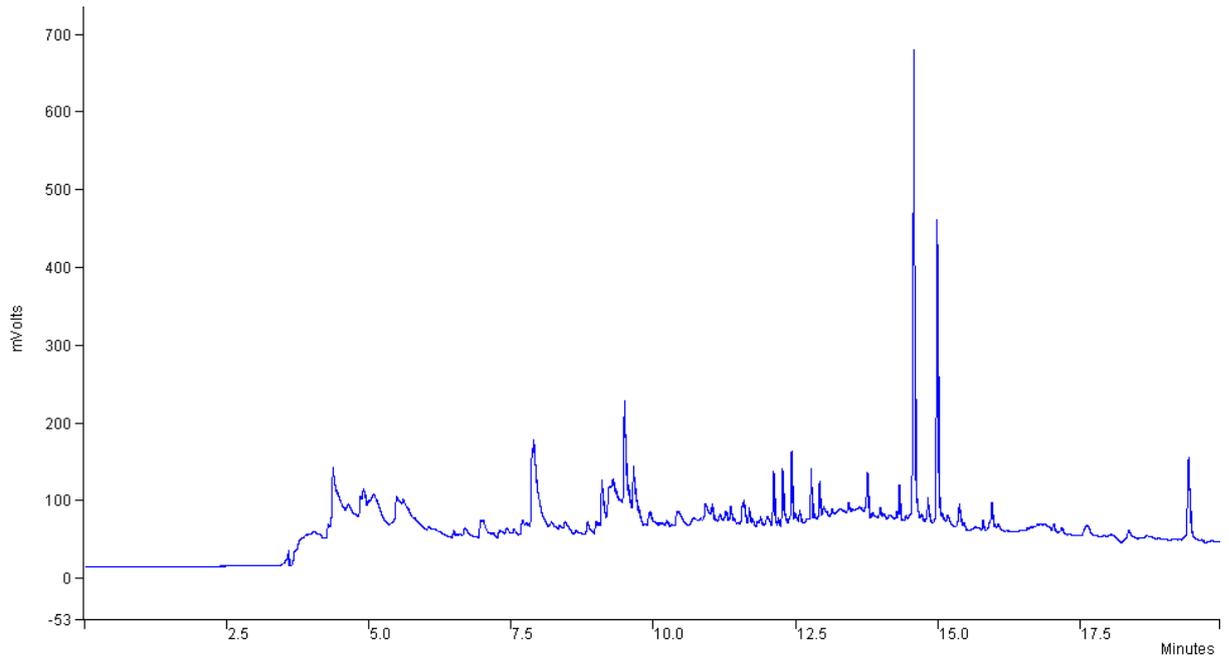
**Figura 20.** Cromatograma ampliado obtido da análise da amostra 1.



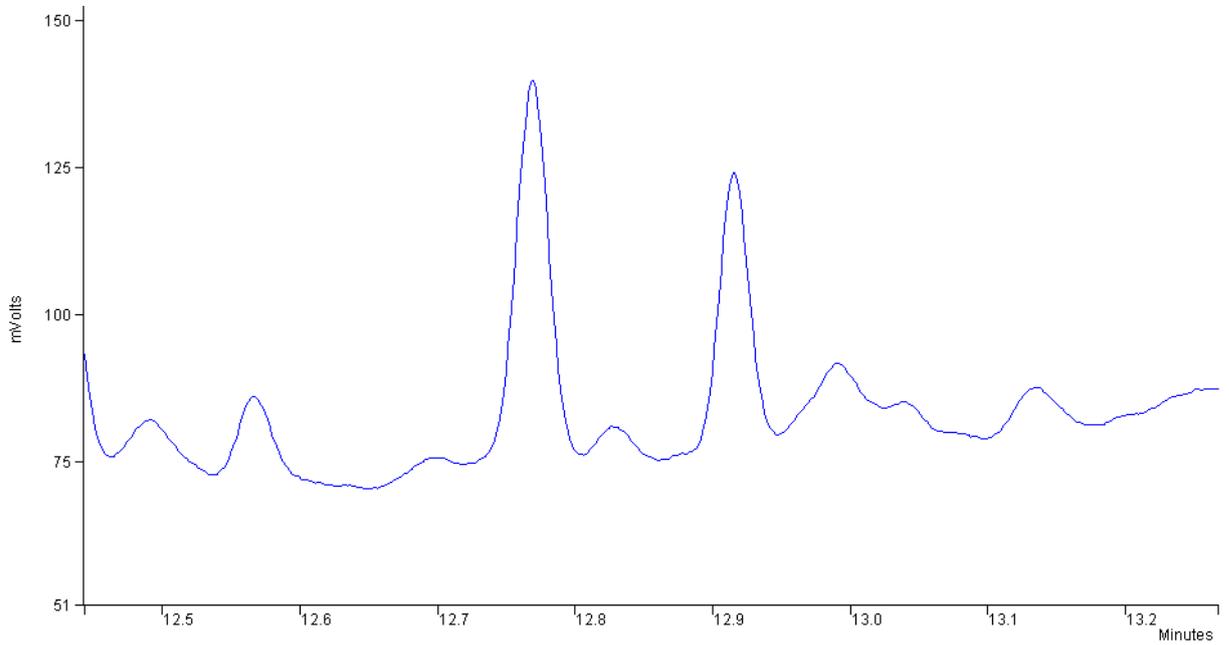
**Figura 21.** Cromatograma obtido da análise da amostra 2.



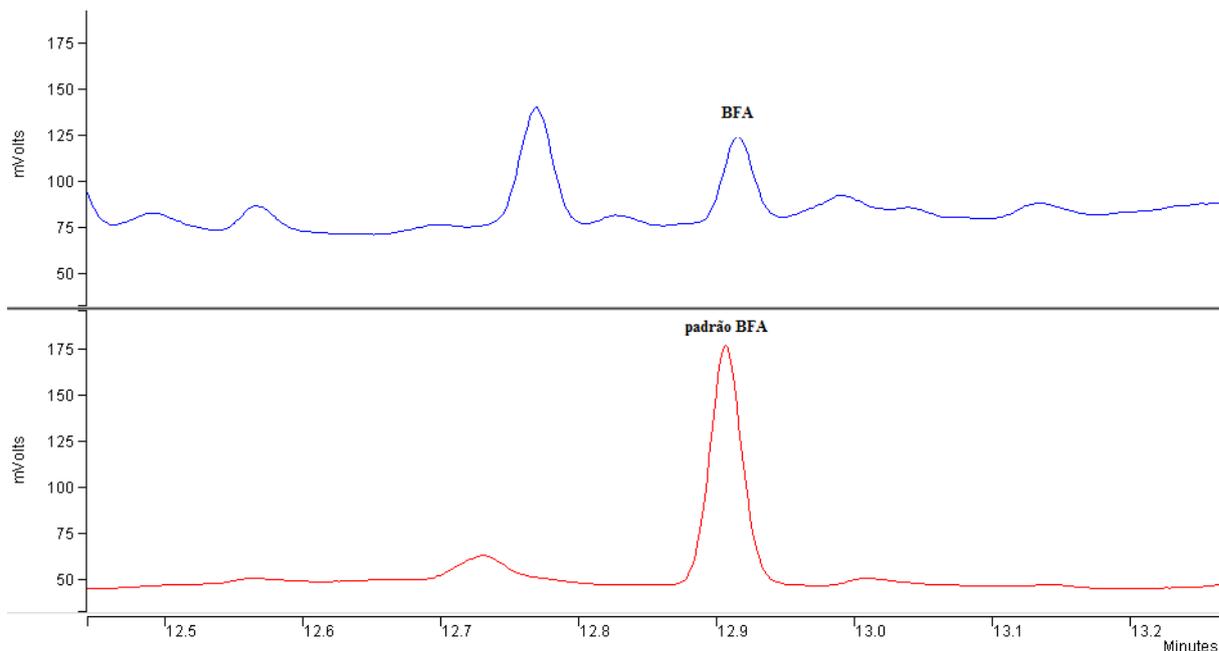
**Figura 22.** Cromatograma ampliado obtido da análise da amostra 2.



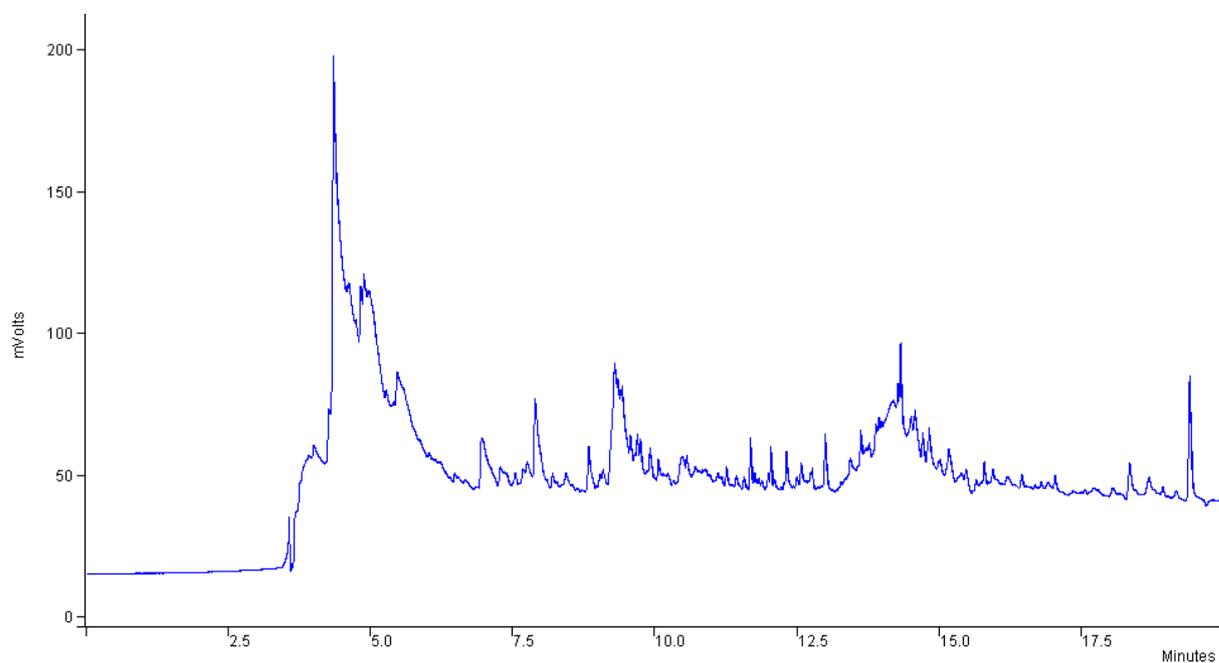
**Figura 23.** Cromatograma obtido da análise da amostra 3.



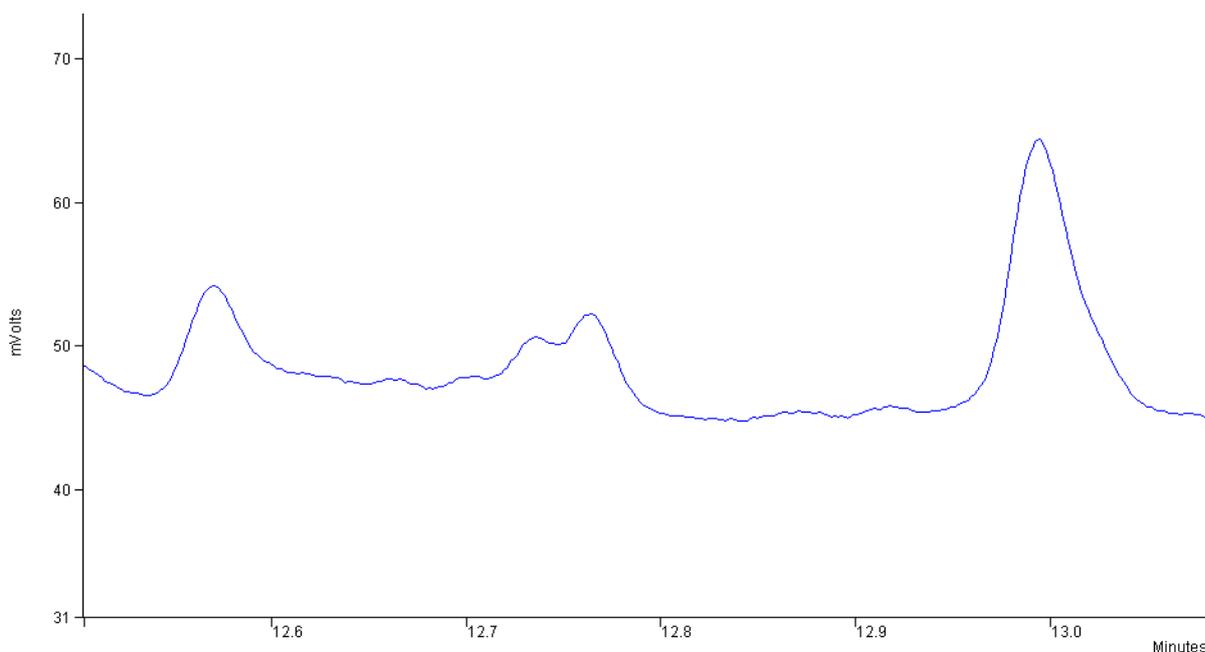
**Figura 24.** Cromatograma ampliado obtido da análise da amostra 3.



**Figura 25.** Cromatogramas ampliados obtidos da análise da amostra 3 e da injeção de padrão de BFA derivado com TFAA na concentração de  $250 \text{ ng mL}^{-1}$ .



**Figura 26.** Cromatograma obtido da análise da amostra 4.



**Figura 27.** Cromatograma ampliado obtido da análise da amostra 4.

A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos da aplicação do método de análise (em triplicata) nas amostras.

**Tabela 8.** Resultados da análise de BFA em água mineral

| <b>Amostra</b> | <b>Concentração (ng mL<sup>-1</sup>)</b> |
|----------------|--|
| 1              | ≤ LD                                     |
| 2              | ≤ LD                                     |
| 3              | 0,46                                     |
| 4              | ≤ LD                                     |

Não existem parâmetros de quantidade aceitável para BFA em água mineral junto aos órgãos regulamentadores do Brasil.

Os resultados obtidos não expressam o real tipo de contaminação, ou seja, não se tem como apontar se o motivo do BFA ter sido encontrado na amostra 3 tem origem da fonte de obtenção da água mineral, se migrou da embalagem que a contém, se foi algum tipo de contaminação oriunda do processo de embalagem, etc.

## 6 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Uma metodologia utilizando a CG/DCE para análise de BFA em água mineral foi desenvolvida e validada, vindo a somar às metodologias existentes a utilização deste tipo de equipamento ampliando o leque de instrumentação utilizado para verificação e monitoramento deste contaminante.

A EFS mostrou-se adequada, fácil de ser realizada e relativamente rápida.

O método de análise de BFA proposto forneceu bons limites de quantificação, limite de detecção e linearidade da curva analítica (coeficiente de correlação 0,9928). O método proposto também foi considerado seletivo, preciso e exato, haja vista as recuperações terem se encontrado dentro da faixa de 70 – 120% e os valores de CV(%) terem sido inferiores aos 20% recomendado pela literatura.

Quando aplicado à amostras reais, o fato de apenas uma das amostras ter apresentado valor detectável de BFA não isenta a preocupação de monitorar e acompanhar os níveis desse preocupante contaminante nesse tipo de produto, sendo que o resultado obtido não expressa formas ou rotas de contaminação, apenas serve para demonstrar a aplicabilidade da metodologia proposta para quem dispõe de tal equipamento.

Pelos resultados obtidos, conclui-se que a metodologia proposta pode ser utilizada em análises de monitoramento de BFA em água mineral, com alto grau de confiabilidade.

Dado o potencial de efeitos deletérios para a saúde humana advindos da presença desse composto (BFA) no meio ambiente e em água mineral em particular, recomenda-se que estudos de monitoramento e identificação de possíveis caminhos de contaminação sejam realizados nas águas minerais comercializadas em Campo Grande/MS, tendo em vista o crescente consumo de água mineral por toda a população.

Apesar dos muitos pontos conflitantes e de muitas arestas a serem aparadas há um consenso comum em relação às evidências de atividades deletérias de algumas substâncias exógenas, dentre elas o BFA, para o sistema endócrino. Resta estabelecer testes de detecção destas atividades a fim de que seja possível elaborar um sistema de vigilância e prevenção, tanto para o ambiente quanto para a saúde humana.

Recomenda-se também que os órgãos nacionais ligados à saúde e ao meio ambiente passem a considerar os contaminantes endócrinos, entre eles o BFA, como passíveis de controle, estabelecendo limites para esses compostos em produtos de consumo humano, como

bebidas e alimentos, visto que são extremamente danosos e sérios ameaçadores da reprodução animal, principalmente da própria reprodução e sobrevivência humana.

## REFERÊNCIAS

- AKERMAN, M. **Natureza, estrutura e propriedades do vidro**. CETEV – Centro Técnico de Elaboração do Vidro. 37p. São Paulo, 2000.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária: **Resolução RE n. 899 de 29/05/2003**.
- ASHBY, J.; TINWELL, H. **Uterotrophic activity of bisphenol A in the immature rat**. *Environmental Health Perspectives*, v. 106, p. 719-720, 1998.
- ASSUNÇÃO, J. V.; PESQUERO, C. R. **Dioxinas e furanos: origens e riscos**. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo: v. 33, n. 5, 1999.
- AUSTEN I. **Plastic-bottle scare is a boon for some**. *New York Times Online*. 2008. Disponível em: <<http://www.nytimes.com/2008/04/25/business/worldbusiness/25plastic.html>>. Acesso em: 10 nov. 2008.
- AZEVEDO, D. A.; LACORTE, S.; VIANA, P.; BARCELO, D. **Occurrence of nonylphenol and bisphenol-A in surface waters from Portugal**. *Brazil, Sociedade Brasileira de Química*, v. 4, p. 532-537, 2001.
- BAIRD, Colin. **Química ambiental**. 2. ed., Porto Alegre: Bookman, 622 p. 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*, v. 1121, p. 154-162, 2006.
- BASHEER, C.; LEE, H. K.; TAN, K. S. **Endocrine disrupting alkylphenols and bisphenol A in coastal waters and supermarket seafood from Singapore**. *Marine Pollution Bulletin*, v. 48, p. 1145-1167, 2004.
- BELFROID, A.; VELZEN, M. V.; HORST, B. V.; VETHAAK, D. **Occurrence of bisphenol A in surface water and uptake in fish: evaluation of field measurements**. *Chemosphere*, v. 49, p. 97-103, 2002.
- BERGER, M.; JONISCHKEIT, W.; KLEMM, K.; TERWYEN, H. **Boa relação no custo-desempenho faz do PP um material ideal para formulações**. *Plástico Industrial*, p. 18-29, 1999.
- BIANCO, C.; GRISA, A. M. C.; ANDRADE, M. Z.; LONGO, C.; NASCIMENTO, I. F. **Análise Quantitativa de Plastificante em Solo de Aterro Sanitário**. UCS. 18º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2008. Disponível em: <[http://www.cbecimat.com.br/Trab\\_Completos/404-030.doc](http://www.cbecimat.com.br/Trab_Completos/404-030.doc)>. Acesso em: 06 jun. 2009.
- BILES, J. E.; MCNEAL, T. P. BEGLEY, T. H. HOLLIFIELD, H. C. **Determination of bisphenol A in re-usable polycarbonate food contact plastics and migration to foodsimulating liquids**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 45, p. 3541-3544, 1997.

BIRKETT, J. W.; LESTER, J. N. **Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Process**. 1<sup>st</sup> ed., Lewis Publishers, 2003.

BLASS, A. **Processamento de polímeros**. 2. ed. Florianópolis : UFSC, 312 p. 1988.

BOLZ, U.; KÖRNER, W.; HAGENMAIER, H. **Development and validation of a GC/MS method for determination of phenolic xenoestrogens in aquatic samples**. *Chemosphere*, v. 40, p. 929-935, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 27. Diário Oficial da União, Poder Executivo, de 20 março de 1996.

BRASIL. Portaria 518. Diário Oficial da União, Poder Executivo, de 25 de março de 2004.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Resolução 357. Diário Oficial da União, Poder Executivo, de 18 de março de 2005.

BREDE, C.; FJELDAL, P.; HERIKSTAD, H. **Increased migration levels of bisphenol A from polycarbonate baby bottles after dishwashing, boiling and brushing**. *Food Additives & Contaminants*, v. 20, p. 684-689, 2003.

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

CARWILE, J. L.; LUU, H. T.; BASSET, L. S.; DRISCOLL, D. A.; YUAN, C.; CHANG, J. Y.; YE, X.; CALAFAT, A. M.; MICHELS, K. B. **Polycarbonate Bottle Use and Urinary Bisphenol A Concentrations**. 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>. Acesso em: 12 maio 2009.

CERHR, R. **What is Bisphenol A?** U.S. Department of Health and Human Services, 2008. Disponível em: <<http://cerhr.niehs.nih.gov/chemicals/bisphenol/bisphenol.pdf>>. Acesso em: 10 set. 2009.

COLBORN, T.; DUMANOSKI, D; MYERS, J.P. **O futuro roubado**. Tradução por Cláudia Buchweiz. Porto Alegre: L&PM, 354 p. 2002. Tradução de: *Our Stolen Future*.

CORTEZ, H. **Garrafas de água PET podem conter Xenoestrogênios ou estrogênios ambientais**. 2009. Disponível em: <<http://ocaosambiental.blogspot.com/2009/03/garrafas-de-agua-pet-podem-conter.html>>. Acesso em: 10 out. 2009.

COSTA, L. A. **Desenvolvimento e validação de metodologia de análise de bisfenol A em amostras de águas naturais por CG-EM**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS. 65p. 2008.

D'ALMEIDA, M. L. O.; VILHENA, A.; INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS; CEMPRE. **Lixo municipal: manual de gerenciamento integrado**. 2.ed. São Paulo: Instituto de Pesquisas Tecnológicas. 370 p. 2000.

DANGELO, J. G.; FATTINI, C. A. **Anatomia Humana Básica**. São Paulo: Atheneu, 184 p. 1988.

DANTAS, F. B. H. **Microscopia de varredura aplicada à avaliação de embalagens de vidro**. Informativo CETEA, Campinas, v. 16, n. 2, abr./jun. 2004. Disponível em: <<http://www.cetea.ital.sp.gov.br/infCETEA.htm>> . Acesso em: 20 jun. 2008.

DATAMARK. **Bottled water and carbonated soft drinks**. Disponível em: <[DATAMARK. \*\*Água mineral\*\*. Disponível em: <<http://www.datamark.com.br/newdatamark/download/tecnoplus.pdf>>. Acesso em: 12 fev 2008. 2003b.](http://www.datamark.com.br/ Apresenta ç ã o / P r e s s C e n t e r ? 1 0 0 _ B r i t a i n B r a s i l _ a b . 0 2 _ B o t t l e w a t e r s A n d C a r b o n a t e d S o f t D r i n k s . p d f > . A c e s s o e m : 1 0 j a n . 2 0 0 8 . 2 0 0 3 a .</a></p></div><div data-bbox=)

DEZOTTI, M.; BILA, D. M. **Desreguladores endócrinos no meio ambiente e consequências**. Quimica Nova, v. 30, n.º. 3, p. 651-666, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v30n3/26.pdf>>. Acesso em: 27 de ago. de 2008.

EVANDRI, M. G.; TUCCI, P.; BOLLE, P. **Toxicological evaluation of commercial mineral water bottle in polyethylene terephthalate: a cytogenetic approach with *Allium cepa***. Food Additives and Contaminants., v.17, p.1037-1045, 2000.

FERREIRA, C. P. **Bioquímica Básica**. 5. ed., São Paulo: MNP. 453 p. 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 Res, v. 36, p. 1429–1438, 2002.

FÜRHACKER, M.; SCHARF, S.; WEBER, H. **Bisphenol A: emissions from point sources**. Chemosphere, v. 41, p. 751-756. 2000.

GOETTLICH, P. **Disruptores endócrinos**. 2009. Disponível em: <<http://www.nossofuturoroubado.com.br/old/disruptorestexto.htm>>. Acesso em: 03 out. 2009.

GOLOUBKOVA, T.; SPRITZER, P. M. **Xenoestrogênicos: o exemplo do Bisfenol-A**. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia Metabologia, v. 44, p. 323-330, 2000.

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, v. 142, p. 203-214, 1998.

HALALEH, M. I. H.; FUJII, S.; KORENAGA, T. **Gas chromatography-mass spectrometric method for separation and detection of endocrine disruptor from environmental water samples**. Analytical Chemical Acta, v. 428, p. 227-234, 2001.

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.** Journal of Occupational and Environmental Medicine, v. 59, p. 625-628, 2002.

HEALTH CANADA. **Government of Canada protects families with bisphenol A regulations.** 2008. Disponível em: <[http://www.hc-sc.gc.ca/ahc-asc/media/nr-cp/\\_2008/2008\\_167-eng.php](http://www.hc-sc.gc.ca/ahc-asc/media/nr-cp/_2008/2008_167-eng.php)>. Acesso em: 31 out. 2008.

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

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

HOWDESHELL, K. L.; PETERMAN, P. H.; JUDY, B. M.; TAYLOR, J. A.; ORAZIO C. E.; RUHLEN, R. L.; SAAL, F. S. V.; WELSHONS, W. V. **Bisphenol A is released from used polycarbonate animal cages into water at room temperature.** Environmental Health Perspectives, v. 111, p. 1180-1187. 2003.

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

INMETRO - INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos.** DOQ-CGCRE-008. Revisão: 01 – Março. 2003.

JAIME, S. B. M.; DANTAS, F. B. H. **Embalagens de vidro para alimentos e bebidas: propriedades e requisitos de qualidade.** Campinas: CETEA/ITAL, 180 p. 2005.

JENSEN, T. K.; TOPPARI, J.; KEIDING, N.; SKAKKEBAEK, N. E. **Do environmental estrogens contribute to the decline in male reproductive health?** Clinical Chemistry, v. 41, p. 1896-1901, 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 selected monitoring.** Chemosphere, v. 56, p.1113-1119, 2004.

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

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

KANG, J. H.; KONDO, F.; KATAYAMA, Y. **Human exposure to bisphenol A.** Archives of Environmental Contamination and Toxicology, v. 226, p. 79-89, 2006.

KAWAGUCHI, M.; INOUE, K.; YOSHIMURA, M.; SAKUI, N.; OKANOUCHE, N.; ITO, R.; YOSHIMURA, Y.; NAKAZAWA, H. **Trace analysis of phenolic xenoestrogens on water samples by stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal**

**desorption-gas chromatography-mass spectrometry.** Journal of Chromatography A, v. 1041, p. 19-26, 2004.

KAWAGUCHI, M.; ITO, R.; ENDO, N.; OKANOUCI, N.; SAKUI, N.; SAITO, K.; NAKAZAWA, H. **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, v. 1110, p. 1-5, 2006.

KAWAGUCHI, M.; SAKUI, N.; OKANOUCI, 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, v. 820, p. 49-57, 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, v. 55, p. 1519-1527, 2004.

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 & Chemistry, v. 20, p. 2725-2735, 2001.

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, v. 139, p. 4252-4263, 1998.

LAMBERT, C. LARROQUE, M. **Chromatographic analysis of water and wine samples for phenolic compounds released from food contact epoxy resins.** Journal of Chromatographic Science, v. 35, p. 57-62, 1997.

LE, H. H.; CARLSON, E. M.; CHUA, J. P.; BELCHER, S. M. **Bisphenol A is released from polycarbonate drinking bottles and mimics the neurotoxic actions of estrogen in developing cerebellar neurons.** Toxicology Letters, v. 176, p. 149-156. 2008.

LEANDRO, F. Z.; MARCHI, M. R. **Avaliação de método para a determinação de bisfenol A em águas naturais.** 2006. Disponível em: <<http://sec.s bq.org.br/cd29ra/programa.pdf>>. Acesso em: 20 set. 2009.

LEITE, F. **Validação em Análise Química.** 4. ed. Campinas: Editora Átomo. 278 p. 1998.

LI, J.; ZHOU, B.; LIU, Y.; YANG, Q.; CAI, W. **Influence of the coexisting contaminants on bisphenol A sorption in soil.** Journal of Hazardous Materials, v. 151, p. 389-393, 2008.

LIEBERAN, R. B. e BARBE, P.C. **Propylene Polymers in Encyclopedia of Polymer Science and Engineering,** 2. ed, New York, p. 464-531. 1987.

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

LYONS, G. **Bisphenol A a known endocrine disruptor**. WWF European Toxics Programme Report. 2000. Disponível em: <<http://www.wwf.org.uk/filelibrary/pdf/bpa.pdf>>. Acesso em: 01 abr. 2008.

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

MEYER, A.; SARCINELLI, P. N.; JOSINO, C. M. **Estarão alguns grupos populacionais brasileiros sujeitos à ação de disruptores endócrinos?** Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 15, p. 845-850. 1999.

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

MOL, H. G. J.; SUNARTO, S.; STEIJGER, O. M. **Determination of endocrine disruptor in water alter derivatization with N-metyl-N-(Pert-butyl)dimethyltrifluoroacetamide using gas chromatography with mass spectrometric detection**. Journal of Chromatography A, v. 879, c. 1, p. 97-112, 2000.

MUERZA, A. F. **Impacto ambiental del agua embotellada**. 2007. Disponível em: <[http://www.consumer.es/web/es/medio\\_ambiente/urbano/2007/05/13/162594.php](http://www.consumer.es/web/es/medio_ambiente/urbano/2007/05/13/162594.php)>. Acesso em: 13 set. 2009.

MUI, Y. **Wal-Mart to pull bottles made with chemical BPA**. Washington Post Online. 2008. Disponível em: <[http://www.washingtonpost.com/wpdyn/content/article/2008/04/17/AR2008041704205\\_pf.html](http://www.washingtonpost.com/wpdyn/content/article/2008/04/17/AR2008041704205_pf.html)> Acesso em: 31 out. 2008.

MÜLLER, S.; MÖDER, M.; SCHRADER, S.; POPP, P. **Semi-automated hollow-fibre membrane extraction a novel enrichment technique for the determination of biologically active compounds in water samples**. Journal of Chromatography A, v. 985, p. 99-106, 2003.

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, v. 1038, p. 291-294, 2004.

NALGENE. **BPA and NALGENE**. s. d. Disponível em: <<http://www.nalgeneoutdoor.com/technical/bpaInfo.html>>. Acesso em: 31 out. 2008.

NIRA, B. J.; STEINMETZ R. **Xenoestrogens: The Emerging Story of Bisphenol A**. Trends in Endocrinology and Metabolism, v. 9, p. 124-128, 1998.

ONN W. K.; WOON, L. L.; LENG, S. H. **Dietary exposure assessment of infants to bisphenol A from the use of polycarbonate baby milk bottles**. Food Additives & Contaminants, v. 22, p. 280-288, 2005.

PASSADOR, F. R.; PESSAN, L. A.; RODOLFO JR., A. **Estado de mistura e dispersão de fase borrachosa em blendas PVC/NBR.** *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, vol. 16, n. 3, p. 174-181, 2006.

PEARCE F.; MACKENZIE D. **It's raining pesticides: the water falling from our skies is unfit to drink.** *New Scientist*, v. 161, p. 23, 1999.

PRIOLEAU, R. M. **Recycling of polypropylene**, ACS Symposium Series – Plastics, Rubber, and paper Recycling, v. 609, p. 80-88. 1995.

RAWSON, H. **Properties and applications of glass.** New York: Elsevier, Glass Science and Technology, v. 3, 318 p. 1980.

RETO, M. A. S. **Bahia Pet investe em garrações de 20 L para água mineral.** *Plástico Moderno*. n. 344, p.50. 2003.

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*, v. 27, n. 5, p.771-780, 2004.

RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; ALDA, 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*, v. 1045, p. 85-92, 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?** *Front Biosci*, v. 3, p. 913-921, 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*, v. 51, p. 499–513, 2001.

SADIK, A. O.; WITT, D. M. **Monitoring endocrine disrupting chemicals;** *Environmental Science & Technology*, v. 33, p. 368 - 374. 1999.

SANTAMARTA, José. **A ameaça dos disruptores endócrinos.** *Revista Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável*, Porto Alegre: v.2, n.3, jul.2001.

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*, v. 424, p. 99-110, 1997.

SELLMAN, S. **Heresia Hormonal – A Verdade Mortal Sobre o Estrogênio.** 1996. Disponível em: <<http://www.novatrh.net/hormones.html>>. Acesso em: 30 set. 2009.

SILVA, A. S. **Interferentes Hormonais.** ACPO, 1994. Disponível em <[http://www.acpo.org.br/int\\_hormonais.htm](http://www.acpo.org.br/int_hormonais.htm)>. Acesso em: 3 nov. 2009.

SISINNO, C. L. S.; OLIVEIRA, R. M. **Resíduos sólidos, ambiente e saúde: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 138 p. 2003.

SODRÉ, F. F.; MONTAGNER, C. C.; LOCATELLI, M. A. F.; JARDIM, W. F. **Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos em águas superficiais da região de Campinas (SP, Brasil)**. Journal of the Brazilian Chemical Society; v. 2; p. 187-196. 2007. Disponível em: <<http://lqa.iqm.unicamp.br/cadernos/caderno6.pdf>>. Acesso em: 11 ago. 2009.

SONNENSCHNEIN, C.; SOTO, A. M. **Disruptores endócrinos: una historia muy personal y con múltiples personalidades**. Gaceta Sanitaria, Barcelona. v.16, n. 3. 2002.

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

SUMPTER, J. P. **Xenoendocrine disrupters: environmental impacts**. Toxicology Letters, v. 337, p. 102–103. 1998.

TEVES, M. L. U. **Lixo urbano – contaminação por resíduos de tintas e vernizes**. São Paulo: Fundacentro, 124 p. 2001.

UNGARI, M. B.; **Estudo da Influência do grau de cristalinidade nas propriedades mecânicas do polietileno tereftalato (PET) processado a baixas taxas de resfriamento**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba/PR. 1999.

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

WAGNER, M.; OEHLMANN, J. **Endocrine disruptors in bottled mineral water: total estrogenic burden and migration from plastic bottles**. Johann Wolfgang Goethe University. 86p. Frankfurt, Germany, 2009.

WAISSMANN, W. **Health surveillance and endocrine disruptors**. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v.18, n. 2, 2002.

WHITELEY, K. S.; HEGGS, T. G.; KOCH, H.; MAWER, R. L. **Polylefins in Ullmann's**. Encyclopedia of Industrial Chemistry, 5. ed., New York, p. 487-577. 1982.

XELEGATI, R.; ROBAZZI, M. L. C. C. **Riscos químicos a que estão submetidos os trabalhadores de enfermagem: uma revisão de literatura**. Revista Latino-Americana de Enfermagem, Ribeirão Preto, v.11, n. 3, 2003.

ZAFRA, A; OLMO, D. M.; SUÁREZ0, 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, 2003.