



Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



**DEPARTAMENTO DE HIDRÁULICA E TRANSPORTES
MESTRADO EM TECNOLOGIAS AMBIENTAIS**

LUIZ ANTONIO COSTA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA
DE ANÁLISE DE BISFENOL A EM AMOSTRAS DE ÁGUAS
NATURAIS POR CG-EM**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Ambientais da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, na área de concentração em Tecnologia de Controle de Poluição.

ORIENTADORA: Prof^a Dr^a Marcia Helena de Rizzo da Matta.

**Campo Grande/MS
2008**

Costa, Luiz Antonio
Desenvolvimento e Validação de Metodologia de Análise de
Bisfenol A em Amostras de Águas Naturais por CG/EM.
Luiz Antonio Costa. – Campo Grande, 2008.
xiv, 65p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de
Mato Grosso do Sul, 2008.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Marcia H. de Rizzo da Matta

1. Bisfenol A. 2. Água. 3. CG/EM

FOLHA DE APROVAÇÃO,

Autor: Luiz Antonio Costa

Título: Desenvolvimento e Validação de Metodologia de Análise de Bisfenol A em Amostras de Águas Naturais por CG/EM

Dissertação defendida e aprovada em 26/02/2008, pela comissão julgadora:

Profª Drª Marcia H. de Rizzo da Matta/Departamento de Química da UFMS.

Profª Drª Maria Lucia Ribeiro/Departamento de Hidráulica e Transportes da UFMS.

Prof. Dr. Sílvio César de Oliveira/Departamento de Química da UFMS.

Prof. Dr. Teodorico Alves Sobrinho
Coordenador PGTA.

LUIZ ANTONIO COSTA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA
DE ANÁLISE DE BISFENOL A EM AMOSTRAS DE ÁGUAS
NATURAIS POR CG-EM**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Ambientais da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, na área de concentração em Tecnologia de Controle de Poluição.

ORIENTADORA: Prof^a Dr^a Marcia Helena de Rizzo da Matta.

Campo Grande, fevereiro de 2008.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Marcia H. de Rizzo da Matta
Departamento de Química - DQI/CCET/UFMS

Prof^a Dr^a Maria Lúcia Ribeiro
Departamento de Hidráulica e
Transportes – DHT/CCET/UFMS

Prof. Dr. Sílvio César de Oliveira
Departamento de Química - DQI/CCET/UFMS

À Munira, minha amada, mãe de Márcio
e Gabriel, queridos filhos, a quem também
dedico este singelo trabalho.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho contou com a ajuda fraterna, inestimável e desinteressada de inúmeros companheiros que não mediram esforços para que esta dissertação saísse do plano das idéias.

O agradecimento aqui exarado vai para todos esses amigos que contribuíram valorosamente para a materialização dessas idéias, mas especialmente para os aqui lembrados; mesmo ciente de que palavras não pagam, nem retribuem com o justo valor, a ajuda recebida.

Aos amigos dos Departamentos de Hidráulica e de Química pela compreensão e estímulo, especialmente aos Professores Carlos Nobuyoshi e Teodorico Alves e à Professora Maria Lúcia.

Aos Professores do Mestrado, pelos ensinamentos e aos colegas de turma pela amizade e descontração.

Ao Luiz Leonardo, pela transmissão de seus vastos conhecimentos nos equipamentos e análises laboratoriais com o Cromatógrafo a Gás acoplado ao Espectrômetro de Massas.

Ao César pela amizade e pelo apoio incontinente de todas as horas.

À Mayara e à Leca pela dedicação constante.

Ao Nico pela ajuda na vidraria.

À dona Leo pelos cafezinhos, pipocas e pelas boas conversas...

Ao Émerson Montagner pelo esforço, dedicação, perseverança e companheirismo, explicitando a certeza de que, sem a sua imprescindível ajuda, esse trabalho não seria consumado.

À Munira, minha querida mulher, pelo insopitável incentivo e pela sobrecarga de atividades a que foi submetida, sem queixas, para que o autor se dedicasse a esse trabalho.

A meus filhos, Gabriel, pelas referências médicas e esclarecimentos da endocrinologia e Márcio pelo apoio e incentivo.

À minha querida orientadora, Professora Marcia Helena de Rizzo da Matta, que expendeu seus preciosos momentos para os direcionamentos dos trabalhos sem nunca ter deixado, uma vez sequer, de atender às constantes interpelações do autor.

E finalmente um agradecimento de coração ao Pai amantíssimo e caroável: *Deus, a inteligência suprema, causa primária de todas as coisas* ⁽¹⁾, que permitiu que os amigos do plano maior, auxiliassem na disciplina e na inspiração.

(1) Fonte: KARDEC, ALLAN. *O Livro dos Espíritos*. Araras: IDE, 1994.

“Por nossos filhos e netos, precisamos urgentemente encontrar respostas.
Cada um de nós tem o direito de saber e o dever de aprender.”⁽¹⁾

Al Gore.
Ex-Vice-presidente dos
Estados Unidos (1996).

(1) Fonte: prefácio do livro: **“O Futuro Roubado”** de Theo Colborn, Dianne Dumanoski e John Peterson Myers.

RESUMO

O bisfenol A (BFA) é um monômero amplamente utilizado na fabricação de policarbonato e resinas epóxi. O policarbonato por sua vez é usado largamente numa série de produtos plásticos e sua liberação para o meio ambiente ocorre principalmente durante a sua manufatura. O método proposto neste trabalho foi aplicado satisfatoriamente para determinação e quantificação desse composto em amostras de águas naturais usando Extração em Fase Sólida (EFS), derivação com anidrido trifluoracético - TFAA e análise por Cromatografia a Gás acoplada à Espectrometria de Massas. A calibração da curva analítica foi linear com um coeficiente de correlação (R) $> 0,999$, numa faixa de 5 a 50 $\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. As médias das recuperações de BFA obtidas em amostras de águas naturais fortificadas com 5; 15 e 25 $\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ foram 83; 93 e 105% respectivamente. O tempo de retenção do BFA derivado com TFAA foi de 11,47 min e os limites de detecção e de quantificação para essas amostras foram de 1,5 e 5,0 $\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (ppb), respectivamente. Os resultados obtidos garantem que o BFA pode ser facilmente detectado e quantificado em amostras de águas naturais usando o método proposto, que se mostrou seletivo, exato e preciso.

Palavras-chave: Bisfenol A. Água. CG/EM

ABSTRACT

Bisphenol A (BPA) is widespread used as a monomer in the fabrication of polycarbonate and epoxide resins. Polycarbonate, in turn, is used in a wide array of plastics products and its release into the environment mainly occurs during manufacturing. The proposed method in this study was applied satisfactorily to the determination and quantification of this compound in natural waters by using Solid Phase Extraction (SPE), derivatization with trifluoroacetic acid anhydride - TFAA and analysis by Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry. The analytic curve calibration was linear with a correlation coefficient of (R) $> 0,999$ in the range of 5 – 50 $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$. The average recoveries of BPA in natural waters sample spiked with 5, 15 and 25 $\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ were 83, 93 and 105% respectively. The retention time was 11.75 min for BPA derivatized with TFAA and the detection limit and the quantification limit to those samples were 1.5 and 5.0 $\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (ppb), respectively. 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. Water. GC/MS

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1.	Fórmula estrutural do BFA.	7
Figura 3.2.	Diferenças das estruturas do BFA e dos hormônios estrógenos.	8
Figura 3.3.	Processo de produção do policarbonato.	8
Figura 3.4.	O sistema endócrino.	17
Figura 4.1.	Fluxograma da extração.	34
Figura 4.2.	Reação de derivação do BFA com Anidrido trifluoracético -TFAA.	35
Figura 4.3	Reação de derivação do BFA com bis (trimetilsilil) trifluoracetamida – BSTFA.	36
Figura 5.1.	Cromatograma obtido no modo <i>SCAN</i> pela injeção de 1,0 μL de solução (10,0 $\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) padrão de BFA sem derivação.	39
Figura 5.2.	Fragmentograma do BSTFA sem derivação.	40
Figura 5.3.	Cromatograma obtido no modo <i>SCAN</i> pela injeção de 1,0 μL de solução (10,0 $\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) padrão de BFA derivado com TFAA.	40
Figura 5.4.	Fragmentograma do BFA derivado com TFAA.	40
Figura 5.5.	Cromatograma obtido no modo <i>SCAN</i> pela injeção de 1,0 μL de solução (10,0 $\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) padrão de BFA derivado com BSTFA.	40
Figura 5.6.	Fragmentograma do BFA derivado com BSTFA.	41
Figura 5.7.	Cromatograma obtido no modo <i>SIM</i> pela injeção de 1,0 μL de solução (125,0 $\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) padrão BFA.	42
Figura 5.8.	Curva analítica de BFA sem derivação.	43
Figura 5.9.	Cromatograma obtido pela injeção de 1,0 μL de uma solução de BFA (10,0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) derivado com TFAA.	43
Figura 5.10.	Curva analítica do BFA derivado com TFAA.	44
Figura 5.11.	Cromatograma obtido no modo <i>SIM</i> pela injeção de 1,0 μL de solução (80,0 $\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) padrão de BFA derivado com BSTFA.	44
Figura 5.12.	Curva analítica do BFA derivado com BSTFA.	45
Figura 5.13.	Cromatograma do branco.	46
Figura 5.14.	Cromatograma da mostra testemunha.	46
Figura 5.15.	Cromatograma pela injeção de 1,0 μL de uma solução de BFA (10,0 $\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) derivado com TFAA.	47
Figura 5.16.	Cromatograma obtido dos ensaios de recuperação de uma amostra fortificada com 5,0 $\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (1LQ) de BFA.	48
Figura 5.17.	Cromatograma obtido dos ensaios de recuperação de uma amostra fortificada com 15,0 $\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (3LQ) de BFA.	48
Figura 5.18.	Cromatograma obtido dos ensaios de recuperação de uma amostra fortificada com 25,0 $\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (5LQ) de BFA.	48
Figura 5.19.	Cromatograma obtido da análise da amostra do Lago do Amor.	50
Figura 5.20.	Cromatograma obtido da análise da amostra do Córrego Cabaças.	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1.	Propriedades físicas do BFA	10
Tabela 3.2.	Glândulas endócrinas, hormônios e suas funções	16
Tabela 4.1.	Condições analíticas do CG	38
Tabela 5.1.	Tempo de reação e íons monitorados no modo <i>SIM</i>	41
Tabela 5.2.	Limite de detecção e limite de quantificação para o BFA	42
Tabela 5.3.	Equações das retas (y) e coeficientes de correlação (r)	45
Tabela 5.4.	Dados obtidos dos ensaios de recuperação referentes à análise de BFA em águas naturais	49
Tabela 5.5.	Resultado das análises cromatográficas de amostras reais na UFMS	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BFA	Bisfenol A
BPA	Bisphenol A (Bisfenol A)
BSTFA	Bis(trimetilsilil) trifluoracetamida
CG	Cromatografia a gás
CG/EM	Cromatografia a Gás acoplada à Espectrometria de Massas
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
CV	Coefficiente de Variação
BDO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DCM	Diclorometano
DQI	Departamento de Química
DHT	Departamento de Hidráulica e Transportes
EFS	Extração em Fase Sólida
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Ensaio de Imunoadsorção Enzimática)
EM	Espectrometria de Massas
EPA	Environmental Protection Agency (Agência de Proteção Ambiental - EUA)
EUA	Estados Unidos da América
GC/MS	Cromatografia a Gás acoplada à Espectrometria de Massas
LD	Limite de Detecção
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia em Fase Líquida de Alta Performance)
ICH	International Conference on Harmonization (Conferência Internacional de Harmonização)
IUPAC	Internacional Union of Pure and Applied Chemistry (União Internacional de Química Pura e Aplicada)
LQ	Limite de Quantificação
LP-3	Laboratório de Pesquisa - 3
PA	Para Análise
SCAN	Modo de varredura do Cromatógrafo
SIM	Single Íon Monitoring (Monitoramento de íon selecionado)
SPE	Solid Phase Extraction (Extração em Fase Sólida)
TFAA	Trifluoroacetic acid anhydride (Anidrido trifluoracético)

LISTA DE SÍMBOLOS

μg	micrograma
μL	microlitro
eV	elétron Volt
H_0	hipótese nula
H_1	hipótese alternativa
kg	quilograma
kPa	quiloPascal
L	litro
m	metro
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
n	número de replicatas
ng	nanograma
Pa	Pascal
pg	picograma
ppm	partes por milhão
ppb	partes por bilhão
ppt	partes por trilhão
R	coeficiente de correlação
s	desvio padrão da resposta
S	inclinação ou coeficiente angular

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
LISTA DE SÍMBOLOS	xi
RESUMO	vii
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo Geral	3
2.2 Objetivo Específico	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 Produção do Bisfenol A – BFA	6
3.2 Diferenças Estruturais do BFA e dos Estrógenos	7
3.3 Aplicação do BFA	8
3.4 Propriedades Físicas do BFA	9
3.5 Efeitos do BFA no Meio Ambiente	10
3.5.1 BFA nos Ambientes Aquáticos	11
3.5.2 BFA no Ar	12
3.5.3 BFA no Solo	13
3.6 Efeitos do BFA na Saúde Humana e na Saúde Animal	14
3.6.1 O Sistema Endócrino	15
3.6.2 Mecanismo de Ação dos Hormônios	17
3.6.3 Desreguladores Endócrinos	18
3.7 Métodos de Análise do BFA	19
3.8 Validação da Metodologia Analítica	21
3.8.1 Parâmetros Analíticos para Validação de Métodos Analíticos	22
3.8.1.1 Seletividade	22
3.8.1.2 Linearidade	23
3.8.1.3 Faixa Linear de Trabalho	23
3.8.1.4 Sensibilidade	23
3.8.1.5 Precisão	24
3.8.1.6 Repetitividade	25

3.8.1.7	Precisão Intermediária	25
3.8.1.8	Reprodutibilidade	26
3.8.1.9	Exatidão	26
3.8.1.10	Limite de Detecção	28
3.8.1.11	Limite de Quantificação	29
3.8.1.12	Robustez	30
4.	METODOLOGIA	31
4.1	Padrões, Reagentes e Soluções	31
4.2	Amostragem	31
4.2.1	Amostras Testemunhas	31
4.2.2	Amostras de Águas Naturais	31
4.3	Metodologia Analítica	32
4.3.1	Sistema Cromatográfico	32
4.3.2	Tratamento das Amostras	33
4.3.3	Método de Extração	33
4.3.4	Derivação	34
4.3.5	Análise por CG	36
4.3.6	Preparo das Amostras	36
4.3.7	Condições Analíticas do Equipamento Utilizado	37
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	39
5.1	Parâmetros Cromatográficos	39
5.2	Elaboração das Curvas Analíticas	41
5.2.1	Limite de Detecção e Limite de Quantificação	41
5.2.2	Curva Analítica para o BFA sem Derivação	42
5.2.3	Curva Analítica para o BFA derivado com TFAA	43
5.2.4	Curva Analítica para o BFA derivado com BSTFA	45
5.2.5	Resumo das Equações de Retas e Coeficientes de Correlação Obtidos	45
5.3	Validação da Metodologia	46
5.3.1	Seletividade	46
5.3.2	Linearidade e Faixa Linear de Trabalho	47
5.3.3	Ensaio de Recuperação	47
5.3.3.1	Exatidão	49
5.3.3.2	Precisão	49
5.3.4	Análise das Amostras Reais de Águas Naturais	50

6.	CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	52
6.1	Conclusões	52
6.2	Recomendações	52
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
	APÊNDICES	63
	Mapas dos Locais das Coletas de Águas Naturais	64
	Local das Amostras Coletadas no Lago do Amor	64
	Local das Amostras Coletadas no Córrego Cabaças	65

1. INTRODUÇÃO

As grandes corporações transnacionais com suas atividades, que por suas próprias naturezas, devem ser destruidoras do meio ambiente, são as maiores responsáveis pela terrível e recente destruição ambiental, agora tentam mostrar seus novos interesses em “salvar o ambiente global”, mera estratégia para conquistarem seus reais objetivos, sendo o mais notável deles, a montagem de um mercado global para seus produtos (INTERNATIONAL STUDIES ASSOCIATION, 1996).

Contaminantes ambientais mais conhecidos como desreguladores endócrinos interferem no mecanismo que governa o desenvolvimento reprodutivo dos seres humanos e de várias espécies como répteis, roedores, aves e tantas outras (Stocker, *et al.*, 2003).

Descargas constantes desses produtos no meio ambiente podem levar a sérios problemas de saúde em animais e em seres humanos, afetando plantas e organismos aquáticos, incluindo a bioacumulação nos tecidos dos peixes (Steinmetz, *et al.*, 1998).

Enormes problemas ao meio ambiente e às vidas selvagem e humana surgem com a chegada ao meio ambiente desses compostos, extremamente tóxicos e apesar das controvérsias, estudos mostram que seus efeitos adversos à saúde humana e animal ocorrem mesmo em doses muito baixas (Tsutsumi, 2005).

Desreguladores endócrinos têm muito a ver com a saúde humana e a vida dos animais selvagens e quando essas substâncias estão presentes no meio ambiente, podem afetar o desenvolvimento do indivíduo adulto, sua população e a comunidade (Marchesini, *et al.*, 2005).

A liberação desses compostos no meio ambiente é de interesse muito grande para as organizações ambientais, devido as suas ocorrências freqüentes e também devido as suas elevadas toxicidades que interagem com o sistema hormonal humano, favorecendo o desenvolvimento de cânceres, as alterações de funções imunes, o decréscimo de fertilidade, a alteração da expressão genética no sistema reprodutivo feminino, a alteração no comportamento maternal e sexual (Zafra, *et al.*, 2003).

Muitas pesquisas ultimamente constataram um grande crescimento da lista de contaminantes ambientais, oriundos de fontes antropogênicas, que provocam desregulação endócrina nos processos reprodutivos em inúmeros organismos, imiscuindo-se com os receptores de hormônios femininos, os estrógenos (Laganà, *et al.*, 2004; Ghisari & Bonfeld-Jorgensen, 2005).

O bisfenol A (BFA) tem motivado muitos debates a seu respeito depois que pesquisadores da faculdade de Medicina da Universidade de Stanford em Palo Alto descobriram que esse produto era mais um mimetizador do estrógeno, o principal hormônio feminino, e estava sendo liberado por um tipo totalmente diferente de plástico, o policarbonato, usado em laboratórios e em inúmeros produtos de consumo humano, como galões de água para beber (Colborn, *et al.*, 2002).

Essa descoberta fora acidental e surgiu quando os cientistas pesquisavam células sensíveis ao estrógeno. David Feldman, Professor de Medicina e seus colegas de Stanford descobriram na levedura uma proteína que se liga ao estrógeno e acharam que pudesse ser um receptor primitivo de estrógeno; se assim fosse, então deveria existir um hormônio da levedura e tentavam encontrá-lo. Em 1984 relatam que a levedura produzia o estradiol. Porém, depois, perceberam que o efeito estrogênico não era causado por um hormônio e sim por uma contaminação, e que a fonte da contaminação era os frascos laboratoriais de policarbonato usados para a esterilização da água nas experiências (Colborn, *et al.*, 2002; Krishnan, *et al.*, 1993; Feldman, *et al.*, 1984; Goloubkova & Spritzer, 2000).

A substância foi identificada como BFA [2,2-bis (4-hidroxifenil) propano]. A equipe de Stanford descobriu que de duas a cinco partes de BFA por bilhão eram suficientes para provocar uma reação estrogênica em células no laboratório (Sonnenschein & Soto, 1998).

As análises dos desreguladores endócrinos nas águas e solos são de suma importância para as organizações ambientais, devido as suas ocorrências freqüentes nos dejetos industriais, lançamentos de esgotos domésticos e águas naturais e por deixarem suas características deletérias, mesmo em dosagens ínfimas, lembrando que o estrógeno natural opera em concentrações baixíssimas medidas em partes por trilhão e os estrógenos fracos estão presentes no sangue e na gordura corporal em concentrações de partes por bilhão ou por milhão; assim, mesmo que os níveis de contaminação pareçam ser minúsculos, não são necessariamente inconseqüentes (Zafra, *et al.*, 2003; Tsutsumi, 2005; Colborn, *et al.*, 2002).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Contribuir para o desenvolvimento e validação de metodologias para avaliação de resíduos de poluentes (traços) em águas naturais.

2.2 Objetivo Específico

O Estudo teve como objetivo específico, desenvolver e validar metodologia de análise de bisfenol A (BFA) em amostras de águas naturais da cidade de Campo Grande/MS, utilizando-se Extração em Fase Sólida (EFS), derivação e análise por CG-EM.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os estudos dos desreguladores endócrinos cresceram muito recentemente e suscitaram debates públicos pelos seus potenciais efeitos adversos que podem resultar da exposição a esses contaminantes. Evidências substanciais apontam que eles têm um potencial de alterar as funções endócrinas normais das vidas selvagem e humana (Tsutsumi, 2005).

Tais contaminantes compõem o grupo de desreguladores endócrinos, definidos pela Agência de Proteção Ambiental Americana *EPA*, (1998), como sendo:

Agentes exógenos que interferem com a síntese, secreções, transportes, ligações, ação ou eliminação de hormônios naturais no corpo, que são responsáveis pela manutenção da homeostase, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento.

Os desreguladores endócrinos foram também definidos no *Scoping Meeting on Endocrine Disruptor* - EUA, 1996 - em seminário realizado juntamente com o *International Program on Chemical Safety* (IPCS) e a *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD) como o termo associado a qualquer substância ou mistura de substâncias exógenas capazes de assumirem função similar à dos hormônios naturais dos seres vivos ou inibirem o funcionamento normal desses hormônios, alterando as funções do Sistema Endócrino, trazendo prejuízos à saúde do organismo, às suas descendências ou população (Bila & Dezotti, 2007; Reys, 2001).

Esses desreguladores endócrinos sintéticos são confundidos pelos organismos com os estrógenos naturais e são acolhidos pelos receptores hormonais, como se fossem hormônios naturais (estrogênios), interagindo com o sistema hormonal humano, apesar de suas estruturas serem completamente diferentes, como se pode observar na Figura 2. (Zafra, *et al.*, 2003; Laganà, *et al.*, 2004).

Mesmo sendo demonstrado por pesquisas que os agentes químicos impostores ligam-se realmente ao receptor do estrógeno, ainda que com estruturas marcadamente diferentes, não se demonstrou o motivo por que o receptor aceita essa impostura (Colborn, *et al.*, 2002; Ghisari & Bonefeld-Jorgensen, 2005).

Muitos estudos são focados na ação estrogênica de inúmeras substâncias químicas sintéticas chamadas xenoestrogênios: são xenobióticos com estrutura não esteróide, porém, com ação similar aos estrogênios endógenos (Sonnenschein & Soto, 1998).

De acordo com vários outros estudos são incluídos também como xenobióticos, substâncias químicas sintéticas que mimetizam os estrogênios, os anti-androgênios e moléculas que atuam no Sistema Endócrino quais as glândulas tireóide, paratireóides, hipófise e o hipotálamo entre outras (Crisp, *et al.*, 1998; Brucker-Davis, 1998; Harrison, *et al.*, 1997).

Nos últimos anos os desreguladores endócrinos têm atraído o olhar do público e da ciência, por conta de suas propriedades estrogênicas e carcinogênicas. O ser humano e os animais estão sendo expostos a complexas misturas desses compostos cujos efeitos são acumulativos e podem vir a aparecer apenas nas próximas gerações. Esses efeitos, sendo irreversíveis, ameaçam o desenvolvimento humano sustentável (Zafra, *et al.*, 2008).

Há mais de cinco décadas observou-se que a exposição da vida e do meio ambiente a substâncias que desencadeavam ação estrogênica poderia resultar em alterações deletérias no desenvolvimento reprodutivo e mesmo comportamental. Na década de 40, alguns ornitologistas americanos, profissionais e amadores, entre eles, o banqueiro Charles Broley, acompanhavam o desenvolvimento da vida selvagem das águias americanas, também conhecidas como águias calvas — o símbolo daquele País—, chegando a apresentar relatórios sobre a numerosa população de águias que nidificavam ao longo de toda Costa Oeste da Península da Flórida. Porém, no final daquela década, em 1947 o número de águias jovens declina assustadoramente. Broley identifica comportamentos bizarros de muitos casais que já não se cortejavam e apresentavam indiferença quanto ao ritual de nidificação; apenas vadiavam. Aquele ornitologista atribuiu então esse comportamento estranho, ao crescimento urbano pós-guerra. Mais tarde, já na década de 50 ele mesmo questiona essa conclusão ao notar que 80% das águias calvas americanas estavam estéreis. Não se poderia por isso responsabilizar-se as escavadeiras que traziam a urbanização (Colborn, *et al.*, 2002).

Ainda naquela década, caçadores ingleses encontravam dificuldade de se encontrar lontras, que desapareceram completamente dos rios e lagos. Suspeitou-se do agrotóxico organoclorado *Dieldrin*. Com o grande crescimento urbano, os criadores de visom tiveram enormes rendimentos, resultado dessa prosperidade. Já na década de 60 a indústria de visom, que cresceu ao redor dos Grandes Lagos devido às grandes ofertas de peixes baratos, sofreu uma queda acentuada na produção, não por decréscimo da demanda e sim por problemas de reprodução animal. As fêmeas não mais produziam filhotes. No início, o número de filhotes

caiu de quatro para dois e já em 1967 muitas fêmeas simplesmente deixaram de procriar e algumas até morriam. Só os criadores que alimentavam seus animais com peixes importados sobreviveram àquela devastação (Colborn, *et al.*, 2002).

No final da década de 30, em 1938, demonstrou-se que certos produtos químicos poderiam ter ação estrogênica ao serem administrados em animais (Goloubkova & Spritzer, 2000).

Tem sido motivo de muitos estudos essa ação estrogênica, principalmente quando vários trabalhos ligam a exposição a essas substâncias ao crescimento do câncer de mama (Aschengrau, *et al.*, 1998) à redução da quantidade de esperma, diminuição da fertilidade (Jensen, *et al.*, 1995; Toppari, *et al.*, 1996), aos defeitos congênitos secundários à exposição fetal (Saunders, *et al.*, 1997) e tantas outras alterações, sendo reconhecido que o número desses compostos químicos que têm o potencial de perturbar o desenvolvimento do sistema endócrino dos organismos tem crescido rapidamente (Roy, *et al.*; 1998).

Em torno de 2-3 mg.L⁻¹ foram detectados em água autoclavada usada no laboratório. Mais tarde, demonstrou-se que o BFA atende a todos os critérios que identificam uma substância estrogênica, com dose mínima efetiva de 10-20 nM (Goloubkova & Spritzer, 2000).

A produção e a liberação desses desreguladores endócrinos têm sido a marca da segunda Revolução industrial e evidências começam a aparecer ligando a contaminação ambiental de rios e lagos com o desenvolvimento e a reprodução de anormalidades nas espécies selvagens (Markey, *et al.*, 2003).

3.1 Produção do Bisfenol A - BFA

O BFA é um monômero advindo da combinação de acetona e fenol, fabricado em altas quantidades e pode ser produzido de dois modos singulares. Um deles, condensando-se o fenol com acetona em meio ácido e em alta temperatura na presença de catalisadores. O BFA é purificado por meio da destilação, depois é filtrado e seco (Staples, *et al.*, 1998).

Outro modo de sua produção é similar e usa variada tecnologia de catálise e purificação. No processo produtivo são gerados resíduos, água de lavagem e efluentes, que podem ser liberados indevidamente dos sistemas fechados durante o processamento na forma de pó e atingir a atmosfera na forma de aerossol. Estimou-se em 1993 que 109 toneladas, cerca de 0,017% das 640 mil toneladas métricas de BFA produzidas, foram liberadas para o ar, para as águas superficiais ou plantas de tratamento de esgotos (Staples, *et al.*, 1998).

O BFA é produzido comercialmente pela reação de condensação catalítica do ácido clorídrico com dois mols de fenol e um mol de acetona sob fluxo borbulhante de cloreto de hidrogênio. Nesse processo, fenol e acetona são injetados num reator recheado de resina catiônica e a conversão em BFA ocorre por volta de 75°C. A mistura entra então em um concentrador, livre de água e acetona sob pressão reduzida. O BFA cristaliza-se em pó branco quando é resfriado e lavado com fenol e destilado sob pressão reduzida (Groshart, *et al.*, 2001).

Em 1999 o consumo mundial anual de BFA foi de dois milhões de toneladas, usados na produção de policarbonatos, resinas epóxi e outros produtos; produção que crescia naquela época 11% ao ano, levando a previsão de produção para 2005 para mais de três milhões e duzentas mil toneladas de BFA (Groshart, *et al.*, 2001).

A estrutura do BFA é apresentada na Figura 3.1 a seguir.

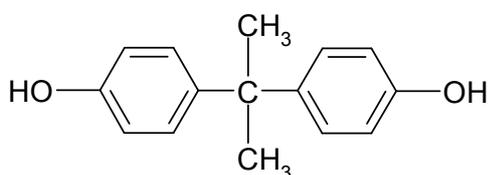


Figura 3.1. Fórmula estrutural do BFA.

Fonte: KANG, *et al.*, (2006b)

3.2 Diferenças Estruturais do BFA e dos Estrógenos

Apesar do fato de o BFA ser confundido pelo organismo com o hormônio feminino estrógeno, vindo a ocupar seus receptores, sua estrutura é completamente diferente desses hormônios, conforme se vê na Figura 3.2 a seguir.

Como produto final, o BFA é usado pela indústria no encapsulamento de componentes eletrônicos, protetores de vidraças, discos compactos na produção de proteção de revestimentos, lentes automotivas, papéis térmicos, papéis de revestimento, no revestimento de componentes eletrônicos, adesivos, cosméticos, materiais de construção, no desenvolvimento de corantes para tintas, como composto e selante dental, como estabilizador ou antioxidante em plásticos (Staples, *et al.*, 1998; Zafra, *et al.*, 2003; Furrhacker, *et al.*, 2000).

Cada vez mais desenvolvidos, novos produtos vêm usando o BFA, sendo caracterizado na classe química dos compostos orgânicos semivoláteis e dos contaminantes super tóxicos e muito persistentes em algumas matrizes, movendo-se facilmente entre elas, detectado em todas as matrizes ambientais como solo, sedimento, água, ar, vegetais e animais. (Berckner, *et al.*, 2004).

Da produção mundial de politoxilatos de alcalilfenol, em torno de 500.000 toneladas das quais aproximadamente 30%, é Americana, estima-se que 60% são destinadas ao meio ambiente aquático (Azevedo, *et al.*, 2001).

Estudos revelam que a polimerização incompleta desses produtos durante a manufatura e/ou a despolimerização devido ao acréscimo de temperatura causam o carregamento do BFA e seus derivados nas latas de conservas (4-23 µg/lata: 7-380 µg/Kg), em bebidas não alcoólicas (7-58 µg/g), em frascos plásticos (7-58 µg/g) e mesmo na saliva (90-913 µg/g) coletada uma hora após aplicação de selante dental (Markey, *et al.*, 2003).

Pode ainda o BFA ser carregado, lixiviado das mamadeiras plásticas aquecidas e dos plasmas estocados em tubos de policarbonato (Kang & Kondo, 2002b).

3.4 Propriedades Físicas do BFA

Em condições normais ambientais o BFA é um sólido, encontrado na forma de cristais, pastilhas ou flocos.

A solubilidade em água do BFA foi pesquisada por grande número de autores sendo determinada na faixa de 120 a 300 mg.L⁻¹. A pressão de vapor apresentou diferentes valores, bem como a densidade e pKa. Pela grande variação da pressão de vapor encontrada, caracterizou-se o BFA como um composto de baixa volatilidade (Staples, *et al.*, 1998).

A Tabela 3.1, a seguir, mostra as principais propriedades físicas deste composto.

Tabela 3.1. Propriedades físicas do BFA

Propriedade	Valor
Massa molar	228 g.mol ⁻¹
Fórmula molecular	C ₁₅ H ₁₆ O ₂
Densidade*	1,060 g.cm ⁻³ 1.195 g.cm ⁻³
Ponto de ebulição	220°C (4 mm.Hg) 398°C (760 mm.Hg)
Ponto de fusão	150 - 155°C 157°C
pKa	{ 9,59, 10,2 11,30
Solubilidade em água*	{ 120 mg.L ⁻¹ 300 mg.L ⁻¹
Pressão de vapor*	{ 4,0 x 10 ⁻⁸ mm.Hg 3,96 x 10 ⁻⁷ mm.Hg 8,70 x 10 ⁻¹⁰ mm.Hg 3,96 x 10 ⁻⁹ mm.Hg

*Valores medidos de 20 a 25°C.

Fonte: Staples, *et al.*, (1998)

3.5 Efeitos do BFA no Meio Ambiente

O BFA chega ao meio ambiente aquático e nas plantas como agente emulsificante de pesticidas e/ou herbicidas (Berkner, *et al.*, 2004), ou vindo do lodo proveniente de esgoto, usado como fertilizante na agricultura, ou da descarga de esgotos domésticos e industriais e também dos lixões e aterros sanitários (Jin, *et al.*, 2004).

Apesar de ter vida curta na atmosfera, o BFA pode vir do ar, da poeira contaminada, pois ele pode ser liberado também na fase de vapor, onde é sujeito à rápida fotoxidação, mediada por radicais hidroxil, e após a condensação, pode cair na atmosfera, sendo liberados em torno de 100 toneladas por ano associado com partículas de aerossóis (Berkner, *et al.*, 2004).

Inúmeros sistemas bióticos e abióticos favorecem a degradação e a dispersão do BFA no meio ambiente (Kang & Kondo 2005; Jang & Wilkie, 2005). O BFA é solúvel em água e

sujeito à adsorção por sedimentos e à biodegradação (Kang & Kondo, 2002a; Kang & Kondo, 2005), pode sofrer fotodegradação (Lee, *et al.*, 2004), fotooxidação (Zhou, *et al.*, 2004). O BFA não tende a ser volatilizado ou hidrolisado em águas naturais (Staples, *et al.*, 1998).

3.5.1 BFA nos Ambientes Aquáticos

O BFA pode ser detectado em estações de tratamento de esgotos e também de tratamento de efluentes de fábricas, principalmente as de indústrias de plástico e de tintas, que o usam como intermediário na produção; não sendo completamente removido durante as fases de tratamento. O efluente dessas estações de tratamento pode ser uma fonte de contaminação do ambiente aquático, já que a redução do BFA durante a etapa de tratamento costuma estar na faixa de 37 a 94% (Kang, *et al.*, 2006).

Conforme pesquisas realizadas em países como os Estados Unidos (Staples, *et al.*, 1999), a Alemanha (Bolz, *et al.*, 2001; Fromme, *et al.*, 2002; Heemken, *et al.*, 2001), o Japão (Matsumoto, 1982) e a Holanda (Belfroid, *et al.*, 2002; Hendriks, *et al.*, 1994), os níveis de BFA encontrados em rios são inferiores, em sua média a $8 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (Belfroid, *et al.*, 2002).

Em águas naturais de rio, o BFA pode ser degradado sob condições aeróbias (Kang; Kondo, 2002a; Klečka, *et al.*, 2001), porém, não sob condições anaeróbias, por ser o BFA refratário a elas (Kang & Kondo, 2002b).

Kang e Kondo (2002a) verificaram que a maioria das bactérias (10 entre 11) isoladas da água de três rios biodegradavam o BFA, porém, com diferenças nas taxas de remoção do BFA (18-91%) e somente duas linhagens (*Pseudomonas* sp. e *Pseudomonas putida*) mostraram alta biodegradabilidade do BFA (aproximadamente 90%).

Mesmo o BFA sendo degradado nos rios por bactérias, a sua meia-vida calculada, de 3-5 dias, pode ser longa o suficiente para provocar efeitos nos organismos aquáticos, mas existem alguns estudos que apontam que o BFA não causa efeitos aos organismos por aparecer em níveis muito baixos (Larsson, *et al.*, 1999; Belfroid, *et al.*, 2002).

A degradação do BFA é influenciada por vários fatores, sendo efetivamente removido da água de esgoto usando-se oxidação eletrolítica em cloreto de sódio elevado. Quanto maior a temperatura, maior a degradação do BFA variando de 2, 3 e 6 dias a 30°C e 4, 5 e 7 dias a 20°C , identificando as bactérias gram-negativas isoladas do lodo enriquecido de BFA na Estação de Tratamento de Esgoto como as grandes responsáveis pela degradação (Kang & Kondo, 2002b).

Outro estudo mostrou também que o BFA degrada-se rapidamente em águas de rio e a meia-vida para sua faixa fica, em média, abaixo de 5 dias. Já a degradação em águas marinhas é bem diferente daquela percebida nos rios, podendo o BFA continuar por longo tempo sem degradação naquelas águas, na faixa de 35 dias, aumentando a possibilidade de contaminação dos organismos marinhos em relação aos organismos de água doce (Kang; Kondo, 2005).

No desenvolvimento da cadeia alimentar, plantas e animais são comidos por outros animais, acumulando o BFA, que tem uma grande afinidade por gorduras, ligando-se fortemente a elas em seus corpos e leites, pelo fenômeno da bioacumulação. Belfroid e colaboradores (2002) mostraram que os níveis de BFA encontrado nas vísceras de peixes variaram de 2 a 75 ng.g⁻¹ em peso seco e em seus músculos encontram-se variação de níveis de 1 a 11 ng.g⁻¹ em peso seco, bem acima da concentração de BFA encontrada na água, que oscilou de 10 a 330 pg.mL⁻¹. Larsson e colaboradores (1999) encontraram na bile de peixes próximos a estações de tratamento de esgoto quantidades de estrogênio de 10⁴ a 10⁶ vezes maior do que as encontradas na água. O que demonstra a bioacumulação do BFA nos organismos aquáticos.

Nos corpos receptores o BFA pode causar diversos impactos ambientais, principalmente na fauna, como a reprodução desordenada, alterações genéticas e malformações congênitas, afetando também a espécie humana se as descargas forem em águas destinadas ao consumo humano ou à recarga de aquíferos, ou se o homem alimentar-se desses animais (Gomes, *et al.*, 2007).

Níveis de contaminação que variaram de 13,3 a 21,31 ng.g⁻¹ foram detectados em frutos do mar vendidos em supermercados de Cingapura, confirmando nova rota de contaminação do homem, o consumo de peixes de água doce e frutos do mar contaminados por BFA (Basheer, *et al.*, 2004).

3.5.2 BFA no Ar

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

Na degradação do BFA por foto-oxidação, a meia-vida calculada por meio de um Programa de Oxidação Atmosférico, varia de 0,74 a 7,4 h e o potencial de transporte de BFA

para o ar é muito mais baixo ($< 0,0001\%$; $2,48 \times 10^{-4}$ a $0,351 \text{ ng.m}^{-3}$) do que para água (30%) ou solo (68%) (Staples, *et al.*, 1998).

Rudel e colaboradores (2001) encontraram concentrações de BFA oscilando entre 2 a 208 ng.m^{-3} em 3 de 7 amostras de ar coletadas em um local de trabalho onde se trabalhava com plásticos, uma residência e um prédio comercial.

Hanaoka e colaboradores (2002) notaram 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. Apesar de o BFA ser carregado pelo ar juntamente com aerossóis, a possibilidade de inalar-se altos níveis de BFA do ar é baixa, sendo, porém, alta, para aqueles que trabalham com produtos baseados no BFA.

3.5.3 BFA no Solo

O BFA liberado no meio ambiente pode chegar ao solo pela aplicação de lodo proveniente de esgoto das estações de tratamento cujos sistemas recebem esgotos contendo BFA, ou sendo lixiviado dos aterros não controlados (lixões). Independentemente do tipo de solo o BFA é rapidamente dissipado e não é detectado em extrato de solo depois de 3 dias de incubação; estimando-se com base nos resultados desses estudos, uma meia-vida de 3 dias. Conclui-se nesse trabalho que o BFA ao chegar ao solo, não se estabiliza e não apresenta biodisponibilidade (Fent, *et al.*, 2003).

Os valores dos coeficientes de adsorção ao solo (K_{oc}) para o BFA variam de 314 a 1524 quando calculados usando-se solubilidade em água de 120 mg.L^{-1} e do coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) de 3,32 (Kang & Kondo, 2006b). O BFA pode ser absorvido na superfície da água ou em grandes profundidades pelo solo ou por sedimentos. Nota-se, que os níveis de BFA encontrados em sedimentos são maiores do que os encontrados em águas superficiais (Bolz, *et al.*, 2000; Fromme, *et al.*, 2002; Heemken, *et al.*, 2001).

Fent, *et al.* (2003) também encontraram em seus estudos, usando ^{14}C -BFA, que a meia vida do BFA em solo é inferior a 3 dias. O maior caminho de dissipação do ^{14}C -BFA foi a formação de resíduos ligados. Contudo, a contaminação do solo por BFA pode ser correlacionada com o aumento da densidade populacional, devido ao aumento da contaminação do solo por BFA oriundo principalmente de águas de efluentes domésticos e/ou industriais (Kawahata, *et al.*, 2004).

Li, e colaboradores (2008) mostram que a presença de metais pesados e surfatantes catiônicos no solo causam um significativo aumento na adsorção de BFA e um aumento do

volume da concentração da meia-vida, pela presença dos metais pesados e notaram que uma grande quantidade de BFA foi absorvido devido à força iônica mais elevada.

O BFA, que é recalcitrante em tratamento anaeróbico, é degradado em ácido 4-hidroxibenzóico e 4-hidroxiacetofenona por bactérias gran-negativas sob condições aeróbicas. A cultura de fungos *Pleurotus ostreatus* também degrada o BFA. Muitos estudos usam solventes orgânicos (acetona ou metanol) adicionados à solução aquosa para dissolver os desreguladores endócrinos. Os nutrientes para os microorganismos podem causar um aumento na demanda bioquímica de oxigênio (DBO) (Tanaka, *et al.*, 2001).

3.6 Efeitos do BFA na Saúde Humana e na Saúde Animal

Os efeitos advindos da presença do BFA no meio ambiente e na alimentação humana dependem basicamente da quantidade presente, do tempo — duração— e época de exposição, principalmente do estado de saúde da pessoa exposta, sendo proporcionais ao período em que o organismo fica exposto a eles, durante seu desenvolvimento (Markey, *et al.*, 2003).

Os produtos conhecidos como desreguladores endócrinos sintéticos mimetizam os estrógenos naturais, sendo confundidos pelos organismos, que os consideram como hormônios femininos, acolhendo-os nos receptores hormonais como tais e agindo como agonista, quando ocupam os receptores hormonais e mimetizam seus efeitos, ou antagonista quando, bloqueando o receptor hormonal (Stoker, *et al.*, 2003) inibindo em grau variado a atividade do hormônio natural (Reys, 2001).

A literatura atual defende quatro modos potenciais de ação do BFA. O primeiro deles é a desregulação endócrina estrógena (o aumento do estrógeno tanto na mulher como no homem é carcinogênico); o segundo é a promoção da progressão tumoral; o terceiro é a toxicidade gênica e o último é a reprogramação gênica que aumenta a suscetibilidade para outros eventos carcinogênicos (útero, mama e próstata) (Keri, *et al.*, 2007). Esses pesquisadores concluíram, baseados nas evidências existentes, que o estradiol natural -17 β é um carcinogênico classificado pela Agência Internacional de Pesquisa do Câncer. Concluíram também que o BFA age como um desregulador endócrino com algumas propriedade estrogênicas entre outras atividades hormonais. Ainda baseados nas evidências, esses estudiosos acreditam que seja possível que o BFA possa induzir transformação celular *in vitro* e em casos de câncer avançado da próstata, possa promover progressão no tumor e reduzir o tempo de recorrência.

Nos animais, os danos gerados pelo BFA são amplos e graves. Ratos e camundongos desenvolvem anormalidades no metabolismo, na reprodução (óvulos e cromossomos) e também no comportamento. O BFA altera a taxa de crescimento desses animais e afeta o crescimento dos testículos, da vesícula seminal, da próstata, da uretra e do pênis e causa diminuição da fertilidade, mudança no comportamento maternal, nos ciclos menstruais e na puberdade (Goloubkova & Spritzer, 2000).

3.6.1 O Sistema Endócrino

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

Os sistemas circulatórios transportam os hormônios endócrinos para as células distribuídas por todo o corpo, incluindo em certos casos, o sistema nervoso, onde se ligam a receptores e iniciam várias reações. Alguns hormônios endócrinos afetam a maioria das células do corpo, como por exemplo, o hormônio do crescimento (hipófise anterior) causa crescimento em quase todas as partes do corpo, enquanto a tiroxina (da tireóide) aumenta a velocidade de muitas reações químicas também em quase todas as células do organismo. (Guyton & Hall, 2002).

A Tabela 3.2, a seguir, relaciona algumas glândulas endócrinas com os hormônios e suas funções.

Tabela 3.2. Glândulas endócrinas, hormônios e suas funções

Glândula	Hormônios	Principais funções
Hipotálamo	Hormônio de liberação da tireotropina (TRH)	Estimula a secreção de TSH e prolactina
	Hormônio de liberação da corticotropina (CRH)	Produz a liberação de ACTH
	Hormônio de liberação do hormônio de crescimento (GHRH)	Causa a liberação do hormônio de crescimento
	Hormônio de liberação das gonadotropinas (GnRH)	Induz a liberação de LH e de FSH
	Dopamina, ou fator inibitório da prolactina (PIF)	Inibe a liberação de prolactina
Hipófise anterior	Hormônio de crescimento (GH)	Estimula a síntese de proteínas e o crescimento global da maioria dos tecidos
	Hormônio tireoestimulante (TSH)	Estimula a síntese e a secreção dos hormônios tireóideos (tiroxina e triiodotironina)
	Hormônio adrenocorticotrópico (ACTH)	Estimula a síntese e a secreção dos hormônios adrenocorticais (cortisol, androgênios e aldosterona)
	Prolactina	Promove o desenvolvimento das mamas femininas e a secreção de leite
	Hormônio foliculoestimulante (FSH)	Causa o crescimento dos folículos, nos ovários, e a maturação dos espermatozoides, nas células de Sertoli, dos testículos
	Hormônio luteinizante (LH)	Estimula a síntese de testosterona nos testículos; estimula a ovulação, a formação do corpo lúteo e a síntese de estrogênio e progesterona nos ovários
Hipófise posterior	Hormônio antidiurético (ADH) (vasopressina)	Aumenta a reabsorção de água pelos rins e causa vasoconstrição e elevação da pressão arterial
Tireóide	Tiroxina (T ₄) e triiodotironina (T ₃)	Aumenta a velocidade das reações químicas na maioria das células, aumentando assim o metabolismo corporal
	Calcitonina	Deposição de cálcio nos ossos e a concentração de íons cálcio no líquido extracelular
Pâncreas	Insulina (células β)	Promove a entrada de glicose nas células, controlando o metabolismo dos carboidratos
	Glucagon (células α)	Aumenta a síntese e a liberação de glicose, pelo fígado
Paratireóide	Hormônio paratireóideo (PTH)	Controla a concentração sérica de íons cálcio aumentando a absorção de cálcio pelo intestino e pelos rins e liberando cálcio dos ossos
Testículos	Testosterona	Promove o desenvolvimento do sistema reprodutor masculino e os caracteres sexuais secundários masculinos
Ovários	Estrógenos	Promove o crescimento e o desenvolvimento do sistema reprodutor feminino, das mamas femininas e dos caracteres sexuais secundários femininos
	Progesterona	Estimula a secreção do “leite uterino” pelas glândulas endometriais do útero e promove o desenvolvimento do aparelho secretor das mamas

Fonte: Guyton & Hall, (2002)

O sistema endócrino no ser humano é mostrado a seguir na Figura 3.4.

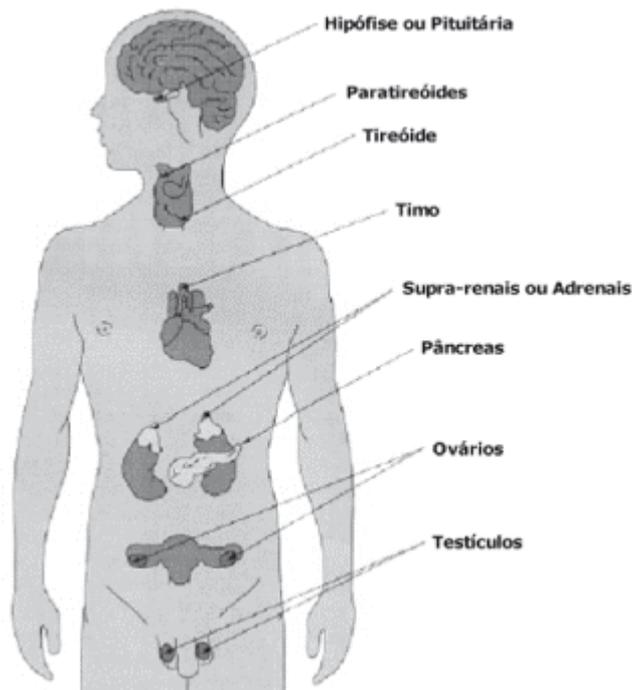


Figura 3.4. O Sistema Endócrino.

Fonte: Ghiselli & Jardim, (2007)

3.6.2 Mecanismo de Ação dos Hormônios

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

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

o crescimento do esqueleto. Os estrogênios atuam também sobre o revestimento mucoso das tubas de Falópio e causam proliferação dos tecidos desse revestimento e afetam ainda a deposição de proteínas, o metabolismo, a deposição de gordura, a distribuição de pelos, a pele e o balanço eletrolítico (Guyton & Hall, 2002).

3.6.3 Desreguladores Endócrinos

O BFA é o mais comum desregulador endócrino estrógeno e as alterações neurocomportamentais induzidas por esses desreguladores são mais problemáticas quando ocorrem em estágios de desenvolvimento sensível do ciclo de vida. As alterações comportamentais são efeito da exposição crônica a baixas doses de BFA (Razzoli, *et al.*, 2005).

Foram observados a desmasculinização e feminilização em peixes (Lutz & Kloas, 1999) em répteis e mamíferos de áreas expostas a produtos químicos industrializados, como herbicidas, fungicidas, pesticidas e efluentes industriais (Colborn, *et al.*, 2002).

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

Já foi encontrado BFA no soro e no fluido folicular em dosagem $1-2 \text{ ng.mL}^{-1}$; em soro fetal (fluido amniótico) entre 15 e 18 semanas de gestação (Tsutsumi, 2005).

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

O BFA tem sido encontrado em concentrações de $1-10 \text{ ng.mL}^{-1}$ no soro de mulheres grávidas, no líquido amniótico dos fetos e no soro tirado do cordão umbilical dos nascituros. Foi também encontrado em concentrações acima de 100 ng/g em placenta (Zoeller, 2005).

Considerando o padrão elevado de exposição humana ao BFA, que acarreta uma absorção diária por pessoa da ordem de 6,6 μg , mostrou-se que a glândula tireóide também sofre com o BFA e que esse composto inibe significativamente a ação dos hormônios tireoidianos (Zoeller, 2005; Ghisari & Bonfeld-Jorgensen, 2005).

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

O BFA causa impactos adversos significativos no desenvolvimento de fetos de inúmeras espécies. Esse dano ocorre em concentrações usualmente encontradas em mulheres grávidas (Roy, *et al.*, 1998; Saunders, *et al.*, 1997).

Muitos estudos associaram as adversidades causadas pelo BFA em embriões de ratos a um aumento de um tipo específico de mutação encontrada em muitos abortos espontâneos em humanos. Notou-se que os danos na divisão celular em ratos foram provocados por níveis baixíssimos de BFA, coincidentemente com os níveis liberados de embalagens de água, fabricadas com a matéria prima do policarbonato (Jensen, *et al.*, 1995; Milligan, *et al.*, 1998).

Ashby e Tinwell, (1998) comprovaram que o BFA gera mutações permanentes nas regiões do encéfalo associadas ao mal de Parkinson. Notaram que em ratos há um crescimento da dependência de drogas como as anfetaminas e que em mulheres pode predispor seus filhos a tendências para estimulantes psicotrópicos.

3.7 Métodos de Análise do BFA

Segundo Kawaguchi e colaboradores (2004), o BFA tem contribuído significativamente para o agravamento dos problemas ambientais, e isso se pode notar pelo crescente número de estudos sobre os efeitos desse produto, mesmo em baixas doses, com muitos métodos analíticos disponíveis para sua determinação no meio aquático.

Há muitos trabalhos que avaliam a exposição humana (Vandenberg, *et al.*, 2007) ao BFA através de inúmeros métodos analíticos, detectando baixas quantidades de BFA na saliva, (Atkinson, *et al.*, 2002; Zafra, *et al.*, 2003) na urina, (Ouchi & Watanabe, 2002), nas amostras de plasma, de tecidos humanos (Vandenberg, *et al.*, 2007) e mesmo em amostras de soro (Yoshimura, *et al.*, 2002; Inoue, *et al.*, 2000; Inoue, *et al.*, 2001; Sajiki, *et al.*, 1999; Yoshimura, *et al.*, 2002), de sêmen (Inoue, *et al.*, 2002b) e do leite materno (Maragou, 2006).

Grande quantidade de métodos analíticos é utilizada para a determinação do BFA em águas (Zafra, *et al.*, 2003); (Laganà, *et al.*, 2004); (Mol, *et al.*, 2000); (Jin, *et al.*, 2004); (Helaleh, *et al.* 2001); (Azevedo, *et al.*, 2001); (Nakamura & Daishima, 2004); (Fromme, *et al.*, 2002); (Liu, *et al.*, 2004); (Kawaguchi, *et al.*, 2004a); (Kawaguchi, *et al.*, 2004a); (Kawaguchi, *et al.*, 2004b) (Leepipatpiboon *et al.*, 2005); (Vilches *et al.*, 2001); (Kawaguchi, *et al.*, 2006); (Müller, *et al.*, 2003); (Ballesteros, *et al.* 2006; Bolz, *et al.*, 2000; Inoue, *et al.*, 2002a; li, *et al.*, 2004).

O ensaio de imunoabsorvência (ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) foi há pouco aprovado como uma técnica sensível para se determinar o BFA (Kawaguchi, *et al.*, 2004).

Entre as técnicas mais recentes, contamos com a extração com carvão ativado (Yoon, *et al.*, 2003), com a micro extração em fase sólida –SPE (Olmo, *et al.*, 2005) e a extração com adsorção com agitação e pressão – *stir-bar sorptive*- (Kawaguchi, *et al.*, 2005; Nakamura & Daishima, 2004).

Na detecção e quantificação confiáveis do analito costuma-se usar a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com Detector Colorimétrico (Inoue, *et al.*, 2002a), ou a de Fluorescência (Yoon, *et al.*, 2003) ou a de Espectrometria de Massa (Rodriguez-mozaz; Alda; Barceló, 2004) e ainda as técnicas eletroquímicas (Schwartz-Mittelman, *et al.*, 2005).

Entre todos os métodos citados, a Cromatografia a Gás acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) é sem dúvida a técnica de detecção e quantificação mais utilizada na análise do BFA (Ballesteros, *et al.* 2006; Olmo, *et al.*, 1997; Olmo, *et al.*, 2005; Gatidou, *et al.*, 2006; Kawaguchi, *et al.* 2005; Vilchez, *et al.*, 2001; Yoshimura, *et al.*, 2002; Zafra, *et al.*, 2003).

Alguns desses métodos usam antes ou durante a análise a derivação, para melhorar a separação e aumentar a sensibilidade. A derivação mais utilizada para o BFA nas análises de amostras por Cromatografia a Gás é a silição, entendida como a substituição de um hidrogênio ativo por um grupo alquilililil como o trimetililil (TMS) ou o t-butildimetililil (t-BDMS).

Comparados aos compostos de origem, os derivados silil são mais voláteis, menos polares e mais estáveis termicamente. Por isso, a separação por Cromatografia a Gás é aprimorada e a detecção é destacada. Porém, se a injeção no cromatógrafo não for imediata, a amostra tratada deve ser completamente selada e lacrada para não se desativar.

3.8 Validação da 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 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.

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.

Pode-se dar 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.

Organismos 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 a respeito (INMETRO, 2003; Brito, *et al.*, 2003; Leite, 1998).

3.8.1 Parâmetros Analíticos para Validação de Métodos Analíticos

Os parâmetros analíticos correntemente aplicados para validação de métodos analíticos de separação são: seletividade, linearidade e faixa de aplicação, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez (Brito, *et al.*, 2003; INMETRO, 2003; Leite, 1998).

3.8.1.1 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 não se assegurar a seletividade, 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 de EM, 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).

3.8.1.2 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.

3.8.1.3 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 dos 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 70 e 120% da concentração teórica para fármacos e medicamentos e de até 120% do limite máximo especificado para determinação de impurezas, são intervalos recomendáveis.

3.8.1.4 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 expressa 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).

3.8.1.5 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 \bar{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).

Consideram-se três níveis de precisão em validações: a repetitividade; a precisão intermediária e a reprodutibilidade.

3.8.1.6 Repetitividade

De acordo com o INMETRO (2003) a repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas de condições de repetitividade (mesmo procedimento de medição, mesmo observador, mesmo instrumento usado sob as mesmas condições, mesmo local e repetições em curto espaço de tempo).

A repetitividade engloba várias medições da mesma amostra, preparadas diferentemente, algumas vezes, denominada precisão intra-ensaio ou intracorrída e pode ser expressa através do RSD (Ribani, *et al.*, 2004).

A ANVISA e a ICH recomendam, para calcular-se a repetitividade, um mínimo de nove determinações cobrindo o limite especificado do procedimento com concentrações baixa, média e alta e em triplicata. O INMETRO sugere sete ou mais repetições para o cálculo da estimativa do desvio padrão e apresenta outra forma de expressar-se a repetitividade, pela expressão:

$$r = 2,8 \times S_r$$

Sendo: r = limite de repetitividade e;

S_r = desvio padrão de repetitividade associada aos resultados considerados.

3.8.1.7 Precisão Intermediária

A concordância entre os resultados de um mesmo laboratório, com outros profissionais analistas em outras datas e também com outros equipamentos, é a base da precisão intermediária (ANVISA, 2003).

De todos os resultados significativos de um laboratório, os que são mais representativos e por isso mais recomendáveis, são aqueles da precisão intermediária e têm

como objetivo, a verificação se num mesmo laboratório, o método alcançará os mesmos resultados (Ribani, *et al.*, 2004).

3.8.1.8 Reprodutibilidade

O grau de concordância entre os resultados das medições de certa amostra que seja submetida a diversas condições de medição como o local de sua realização, o tipo de equipamento e a alternância de operadores é medido pela reprodutibilidade (INMETRO, 2003; Ribani, *et al.*, 2004).

Segundo a ANVISA (2003) a reprodutibilidade está relacionada aos resultados dos estudos de colaboração interlaboratoriais, considerando-a em situações de padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos, por exemplo, em farmacopéias e podendo expressar-se por meio dos valores de RSD.

Outra forma de verificar-se a reprodutibilidade é usar-se o limite de reprodutibilidade (R) predito pelo INMETRO e que permite a análise da significância da diferença entre os valores das duplicatas das amostras analisadas nas condições de reprodutibilidade sendo expresso por:

$$R = 2,8\sqrt{S_R^2}$$

Onde: S_R^2 = variância de reprodutibilidade ligada aos resultados considerados, para cada laboratório envolvido.

3.8.1.9 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.*, 2003).

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 aplicam-se ensaios de recuperação na matriz e quando são elaborados estudos em colaboração (Brito, *et al.*, 2003).

Esses materiais de referência (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).

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

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 nas faixas 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, majora 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 (H_0) $Rec. = 100\%$ e como hipótese alternativa (H_1) $Rec. \neq 100$ 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).

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

Onde: Rec é a recuperação média; s é o desvio padrão das recuperações e n é o número de replicatas.

3.8.1.10 Limite de Detecção

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 sugere uma relação sinal-ruído de 3:1; já o INMETRO recomenda uma relação de três a cinco vezes maior que o sinal do ruído.

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

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

Onde: \underline{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.

3.8.1.11 Limite de Quantificação

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).

3.8.1.12 Robustez

A robustez de um método analítico indica a sensibilidade que ele apresenta perante pequenas variações. Diz-se que um método é robusto quando ele não é afetado por uma pequena e deliberada modificação em seus parâmetros. Para avaliar-se a robustez de um método cromatográfico, costuma-se, na Cromatografia a Gás, variar parâmetros como a programação da temperatura, a natureza do gás de arraste, o tempo de extração, a agitação entre outros (INMETRO, 2003; Ribani, *et al.* 2004).

Existe a recomendação do INMETRO para a determinação da robustez usando-se o teste de *Youden*. Esse teste não só avalia a robustez como também é capaz de ordenar e indicar a influência de cada uma das variações nos resultados finais.

4. METODOLOGIA

4.1 Padrões, Reagentes e Soluções

A solução estoque de BFA (Aldrich, 95%) na concentração de 109 mg.L⁻¹ e soluções de trabalho nas concentrações de 1,0 e 10,0 mg.L⁻¹ foram preparadas em etanol (Vetec, 95%).

A derivação do BFA foi realizada com anidrido trifluoroacético - (TFAA) (Aldrich, 99%) e N O-Bis-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) contendo 10% de trimetilclorosilano (Fluka, 99%).

O acetato de etila e o hexano utilizados foram da J. T. Baker, grau HPLC e o diclorometano da Mallinckrodt, grau HPLC e o metanol grau HPLC da Carlo Erba.

A solução água: metanol, na relação volumétrica 9:1, para lavagem da amostra, foi tratada com carvão ativado.

4.2 Amostragem

4.2.1 Amostras Testemunhas

Em janeiro de 2008 foram coletadas amostras de águas naturais nas coordenadas geográficas 20° 28' 16,05" de latitude Sul e 54° 36' 18,03" de longitude Oeste, em poço sem cloração, a 29 metros de profundidade para servirem de testemunhas, dada a dificuldade de se encontrar água isenta de BFA. Essas amostras foram transferidas para vasilhame âmbar de vidro de 5L e tampado com tampa de vidro.

Anteriormente, foram testadas águas bidestiladas compradas em farmácias, águas de mili-Q produzidas no próprio laboratório da UFMS e até águas do Sistema de Abastecimento Público e, todas elas apresentaram traços de BFA.

4.2.2 Amostras de Águas Naturais

Em janeiro de 2008, durante uma semana chuvosa, foram coletadas amostras de águas naturais no Lago do Amor, nas coordenadas geográficas 20° 30' 13,87" de latitude Sul e 54° 37' 00,90" de longitude Oeste, no Campus da UFMS, em coletor de alumínio de 4L a uma profundidade de 50 cm, temperatura ambiente 25°C e transferidas para vasilhame âmbar de vidro de 5L e tampado com tampa de vidro.

Na mesma época foram coletadas amostras no Córrego Cabaças, nas coordenadas geográficas 20° 29' 54" de latitude Sul e 54° 36' 46,34" de longitude Oeste, antes de sua confluência com o Lago do Amor, também no Campus da UFMS com o mesmo coletor de alumínio, a uma profundidade de 10 cm, temperatura ambiente de 24°C e transferidas para vasilhame âmbar de vidro, tampado com tampa de vidro.

Não se executou procedimento algum para conservação das amostras, pois, foram submetidas ao procedimento analítico imediatamente depois da coleta; foram apenas filtradas com o auxílio de uma bomba de vácuo para a remoção de partículas que poderiam dificultar o procedimento de extração. Os mapas dos locais das coletas das amostras estão apresentados em fotos de satélites nos apêndices no final deste trabalho.

4.3 Metodologia Analítica

Foi realizada busca de literaturas relacionadas ao BFA, aos desreguladores endócrinos, ao meio ambiente e às matrizes água, ar e solo e também à saúde humana, e aos métodos de análise incluindo os equipamentos de cromatografia e de detecção.

O desempenho do sistema analítico (CG/EM) frente ao BFA foi testado utilizando-se, soluções padrão do analito, testando-se inclusive, processos de derivação, na busca de melhores resultados. Assim a resposta do equipamento foi estabelecida quanto à linearidade e quanto aos limites de detecção e de quantificação.

Neste estudo, desenvolveram-se e validaram-se métodos analíticos para a determinação do BFA em águas naturais, utilizando-se Extração Fase Sólida (EFS) e análise por Cromatografia em fase gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM), usando-se para a validação, análises de amostras reais de águas naturais.

4.3.1 Sistema Cromatográfico

Usou-se tal técnica para o desenvolvimento deste trabalho por ser a mais empregada na literatura, visto que apresenta maior sensibilidade que a HPLC-UV e tem a vantagem de apresentar o fragmentograma do analito, o que permite confirmar a sua presença (Atkinson, *et al.*, 2002).

4.3.2 Tratamento das Amostras

Para determinar-se o branco e a amostra testemunha, amostras de água natural, coletadas em poço foram submetidas ao tratamento com carvão ativado comprado da (FLUKA; 90% \geq 53 μ m) por 30 minutos, para eliminarem-se possíveis resíduos de BFA, e então foi procedida a extração conforme método relatado a seguir (Yoon, *et al.*, 2003). As amostras de águas naturais coletadas na UFMS foram todas filtradas com auxílio de bomba de vácuo moderado (254 mm de Hg) para se remover partículas que poderiam dificultar o procedimento de extração, (Filtro Quantitativo JP42-Faixa Azul; gramatura: 80 g.m⁻²; diâmetro igual a 9 cm; permeabilidade ao ar: 3L/S/M²; maioria dos poros: 8 μ m).

4.3.3 Método de Extração

Um volume de 500 mL da amostra, depois de filtrada, foi passada em cartucho de SPE - Extração em Fase Sólida STRATA X de 200 mL x 3 mL, marca PHENOMENEX, num fluxo de 4 mL.min⁻¹, condicionado com 5 mL de acetato de etila; 5 mL de metanol; 5 minutos de repouso e depois, 15 mL da água da amostra testemunha.

A amostra foi lavada, ainda no cartucho, com 10 mL de uma solução de água/metanol na relação volumétrica 9:1, sob vácuo leve, de 254 mm de Hg, e deixada a secar por 15 minutos, também sob o vácuo leve.

Passou-se então no cartucho, 4 mL do eluente metanol (> 99%) sob o fluxo de 1mL.min⁻¹; acondicionou-se o extrato em pequeno frasco de 10 mL e levou-se à secura através de banho-maria a 65°C e sob fluxo de nitrogênio gasoso (N₂), (99,9%), transferindo-a com a redissolução em solvente de análise com 1mL de metanol para um vial de 2,0 mL com tampa roscada e levada novamente à secura pelo fluxo de N₂, (99,9%).

O fluxograma da extração é apresentado na Figura 4.1, a seguir.

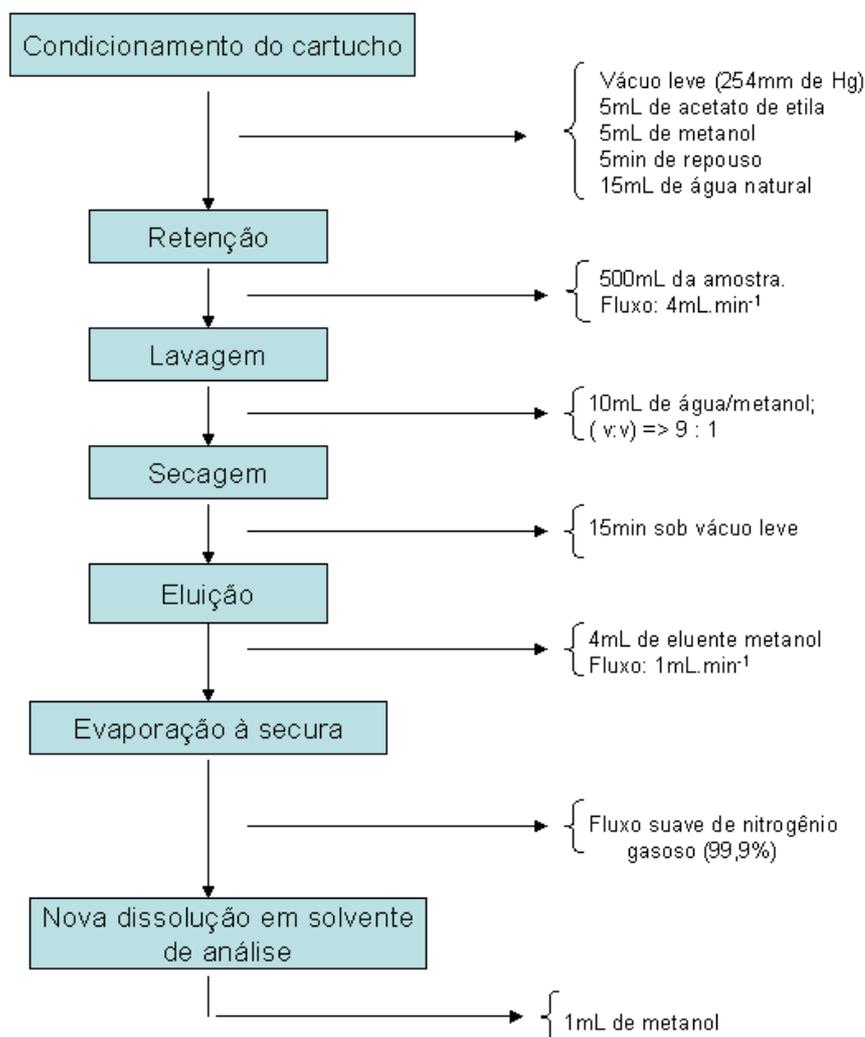


Figura 4.1. Fluxograma da extração.

4.3.4 Derivação

Em Cromatografia dá-se o nome de derivação à reação de transformação de um composto químico em outro, objetivando atingir-se uma análise mais rápida, mais conveniente e mesmo mais exata. O composto resultante deverá ser em relação ao composto originário, extraído ou cromatografado mais facilmente, ser medido com maior sensibilidade ou exatidão ou ser mais facilmente separado de interferentes (Lanças, 1993).

A derivação resolve grandes limitações da Cromatografia a Gás (CG), no tocante aos compostos de alta polaridade, aos de baixa volatilidade e aos que apresentam instabilidade térmica, haja vista que esses compostos não poderiam ser analisados por CG. Por isso, muitas

moléculas são excluídas da análise por CG, porém, conseguirão ser analisadas na forma de um derivado adequado.

No balanço entre os benefícios e as adversidades, julga-se que apesar de a derivação provocar maior número de etapas no processo, fato que induz a um acréscimo na probabilidade de se cometer erros, traz a grande vantagem de se poder analisar um composto, tomando-se o cuidado de se lidar com solventes e reagentes de grande pureza e observar-se o tempo de reação e a estabilidade dos derivados produzidos (Lanças, 1993).

A reação de derivação é caracterizada pela substituição de hidrogênios livres pelo grupo trifluoracetamida e permite maior sensibilidade, deixando a amostra mais identificada com a coluna utilizada.

A seguir, mostra-se, na Figura 4.2, a reação de derivação com TFAA.

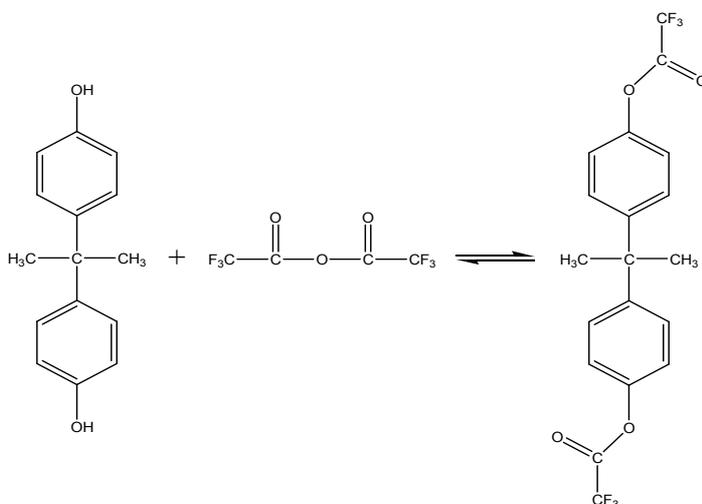


Figura 4.2. Reação de derivação do BFA com anidrido trifluoracético – TFAA.

A seguir apresenta-se na Figura 4.3, a reação de derivação com BSTFA.

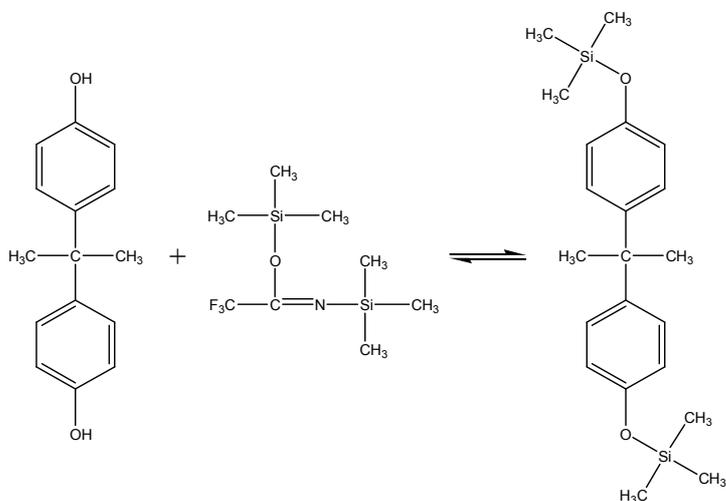


Figura 4.3. Reação de derivação do BFA com bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida – BSTFA.

4.3.5 Análise por CG

Na determinação do BFA, a técnica mais difundida hoje em dia, é a Cromatografia a Gás com derivação, para obter-se um composto mais volátil e também de maior estabilidade térmica, melhorando a sensibilidade (Amarante, *et al.*, 2002b).

4.3.6 Preparo das Amostras

Para a análise de BFA derivado com TFAA, depois da secura, adicionou-se à amostra, 0,5 mL de TFAA e deixou-se por 15 min na estufa a 40°C para a reação de derivação. Depois se adicionou 1,0 mL de hexano e a amostra estava pronta para a análise por CG/EM.

Para a análise de BFA derivado com Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA), pipetou-se 50 µL da solução estoque e transferiu-se para um vial de 2,0 mL e secou-se sob fluxo de nitrogênio (N₂), adicionou-se 0,1 mL de BSTFA e 0,4 mL de diclorometano (DCM) agitando aproximadamente por 5 minutos, secando-se novamente sob fluxo de nitrogênio, acrescentou-se 0,5 mL de DCM e injetou-se 1µL em modo *SCAN* para conhecer-se o tempo de retenção e o espectro de massa, depois se transferiu quantitativamente para um balão de 5 mL com hexano.

4.3.7 Condições Analíticas do Equipamento Utilizado

As análises foram efetuadas em Cromatógrafo a Gás de Alta Resolução GC 37A acoplado a Espectrômetro de Massas QP-5000 (*SHIMADZU*); equipamentos lotados no Departamento de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (DQI).

A coluna utilizada foi Wcot de sílica fundida, CB-Sil 13 CB (50 m x 0,32 mm x 0,4 µm, Varian) para todas as análises. O gás de arraste foi o hélio 5.0 analítico da White Martins e o volume de injeção foi de 1 µL no modo sem divisão (*splitless*). A varredura de íons no modo *SCAN* variou de m/z 60 a 500.

Os espectros foram obtidos pela técnica de impacto eletrônico, com energia de 70 eV. Para a geração dos cromatogramas, dos fragmentogramas e para a quantificação dos analitos foi utilizado o software *CLASS-5000* da *SHIMADZU*.

Para a injeção do BFA sem derivação e com derivação com TFAA e BSTFA as condições do equipamento foram listadas na Tabela 4.1 a seguir.

Tabela 4.1. Condições Analíticas do CG

BFA	Injetor (°C)	Interface (°C)	Coluna (°C)	Pressão na coluna (KPa)	Vazão do gás de arraste (mL.min ⁻¹)	Tempo de análise (min)
Sem derivação	270	280	150 °C (2,0 min)	102,5	1,8	22
			150 → 210 °C (15 °C min ⁻¹)			
			210 → 280 °C (10 °C min ⁻¹)			
Derivado com TFAA	270	280	280 °C (9,0 min)	105,7	2,1	20
			120 °C (2,0 min)			
			120 → 210 °C (15 °C min ⁻¹)			
Derivado com BSTFA	260	270	280 °C (5,0 min)	113,5	2	20
			150 °C (2,0 min)			
			150 → 210 °C (15 °C min ⁻¹)			
			210 → 270 °C (10 °C min ⁻¹)			
			270 °C (8,0 min)			

Conforme se pode notar na quarta coluna, (°C), foi adotada uma rampa de temperatura bem suave, com uma variação máxima de temperatura de 15°C.min⁻¹ evitando-se assim um desgaste prematuro da coluna cromatográfica.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Parâmetros Cromatográficos

Foram preparadas soluções de BFA partindo da solução estoque sem derivação e também com derivação na concentração de $10,0 \text{ mg.L}^{-1}$ (ppm) para injeção no modo *SCAN*, para verificar-se o tempo de retenção do analito e obter-se o seu fragmentograma.

Para as análises sem derivação, alíquotas de solução estoque e de trabalho foram transferidas para *vials* de 2 mL. Depois se secou as amostras sob fluxo de N_2 e retomadas a 1,0 mL com diclorometano e, sem derivar, foram injetadas no CG-EM (Zafra, *et al.*, 2003).

Para as análises com derivação com TFAA, alíquotas de solução estoque e de trabalho foram transferidas para *vials* de 2 mL. Na seqüência as amostras foram secas sob fluxo de N_2 e adicionados 500 μL de TFAA. Os *vials* foram tampados e as amostras agitadas por 2 min. Em seguida os *vials* foram colocados em estufa a 40°C por 15 minutos para que a reação de derivação ocorresse mais prontamente. As amostras foram então secas sob fluxo de N_2 e retomadas em hexano e injetadas no CG-EM (Jin, *et al.*, 2004).

Idem para a derivação com BSTFA, adicionando-se 100 μL de BSTFA e 400 μL de diclorometano. Os *vials* foram tampados e as amostras agitadas manualmente por 2 minutos. As amostras foram então secas sob fluxo de N_2 e retomadas com 1,0 mL de DCM e injetadas no CG-EM (Zafra, *et al.*, 2003).

Os cromatogramas e fragmentogramas obtidos são apresentados nas Figuras, 5.1; 5.2; 5.3; 5.4; 5.5 e 5.6.



Figura 5.1. Cromatograma obtido no modo *SCAN* pela injeção de 1,0 μL de solução ($10,0 \text{ pg.}\mu\text{L}^{-1}$) padrão de BFA sem derivação.

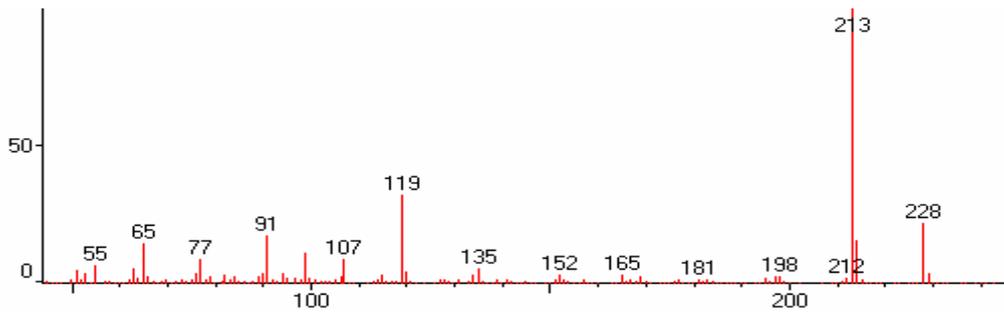


Figura 5.2 Fragmentograma do BFA sem derivação.

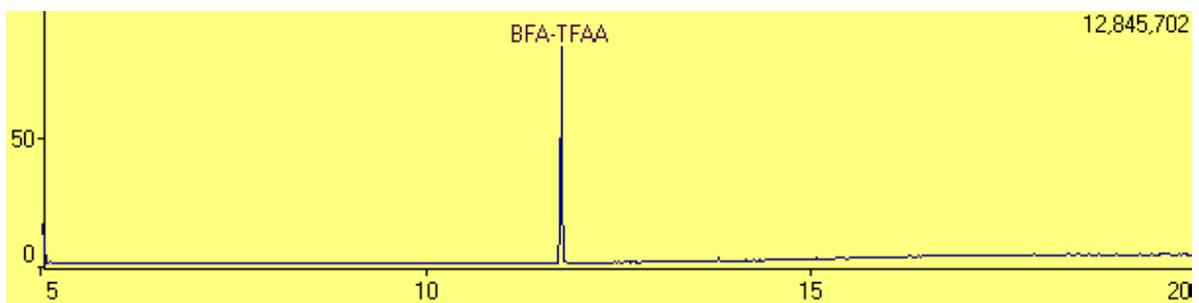


Figura 5.3 Cromatograma obtido no modo *SCAN* pela injeção de 1,0 μL de solução ($10,0 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) padrão de BFA derivado com TFAA.



Figura 5.4. Fragmentograma do BFA derivado com TFAA.

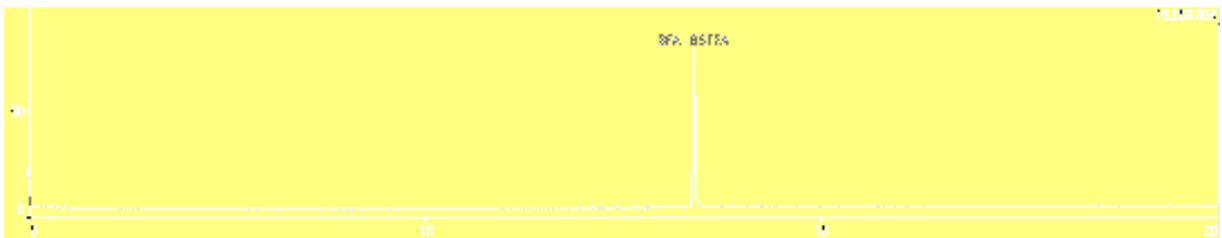


Figura 5.5. Cromatograma obtido no modo *SCAN* pela injeção de 1,0 μL de solução ($10,0 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) padrão de BFA derivado com BSTFA.

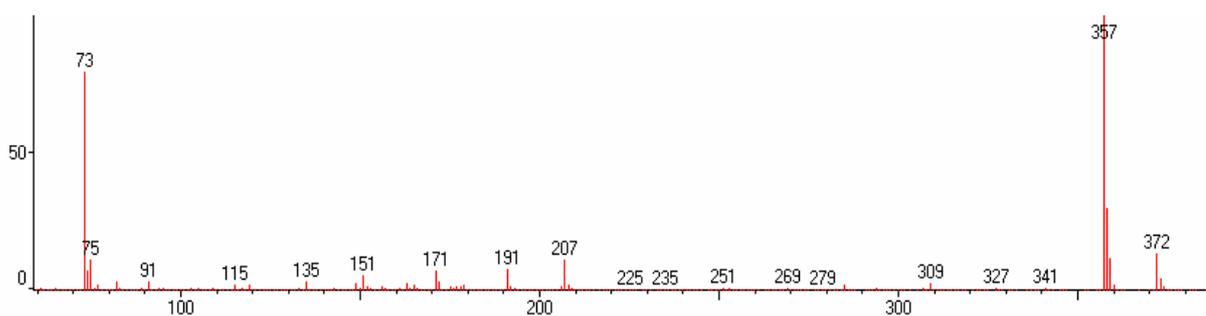


Figura 5. 6. Fragmentograma do BFA derivado com BSTFA.

A partir dos fragmentogramas obtidos foram selecionados íons para análise no modo *SIM* e estão apresentados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1. Tempo de retenção e íons monitorados no modo *SIM*

BFA	Tempo de Retenção (min)	Íons monitorados (<i>m/z</i>)
Sem Derivação	14,39	213,15 e 228,20
Derivado com TFAA	11,75	405,15; 406,10 e 420,10
Derivado com BSTFA	13,44	357,30 e 372,30

O derivatizante escolhido foi o TFAA com tempo de retenção de 11,75 minutos.

5.2 Elaboração das Curvas Analíticas

5.2.1 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 diferentes amostras com concentrações conhecidas. Essas amostras foram injetadas até se obter um sinal referente ao analito 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.

Os valores encontrados para LD e LQ sem, e com as derivações com TFAA e BSTFA estão relacionados na Tabela 5.2, a seguir.

Tabela 5.2. Limite de detecção e limite de quantificação

BFA	LD (pg. μL^{-1})	LQ (pg. μL^{-1})
Sem Derivação	7,5	25,0
Derivado com TFAA	1,5	5,0
Derivado com BSTFA	4,5	16,0

Os limites inferiores (LD e LQ) da curva analítica do BFA derivado com TFAA apresentaram melhores resultados, como se nota na segunda e terceira colunas (1,5 e 5,0 $\text{pg.}\mu\text{L}^{-1}$).

5.2.2 Curva Analítica para o BFA sem Derivação

Para elaboração da curva analítica, do BFA sem derivação, foram preparadas e analisadas, em triplicata, soluções padrão nas concentrações de 25, 50, 75, 100, 125 e 250 $\text{pg.}\mu\text{L}^{-1}$.

Exemplo de cromatograma obtido para o BFA no modo *SIM* nas concentrações utilizadas para a construção da curva analítica é apresentado na Figura 5.7.

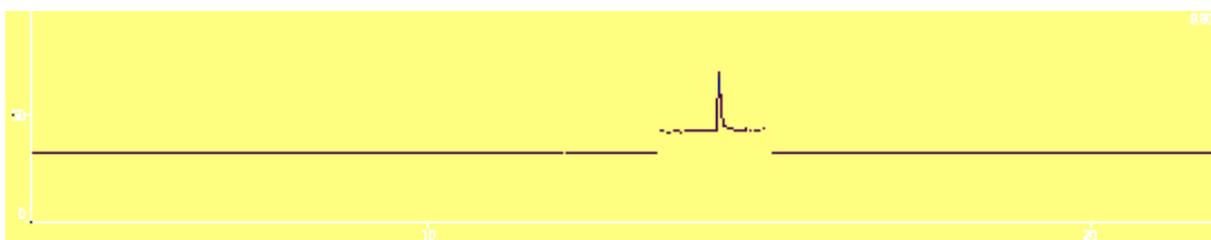


Figura 5.7. Cromatograma obtido no modo *SIM* pela injeção de 1,0 μL de solução (125,0 $\text{pg.}\mu\text{L}^{-1}$) padrão de BFA.

A Figura 5.8 mostra a curva analítica do BFA sem derivação.

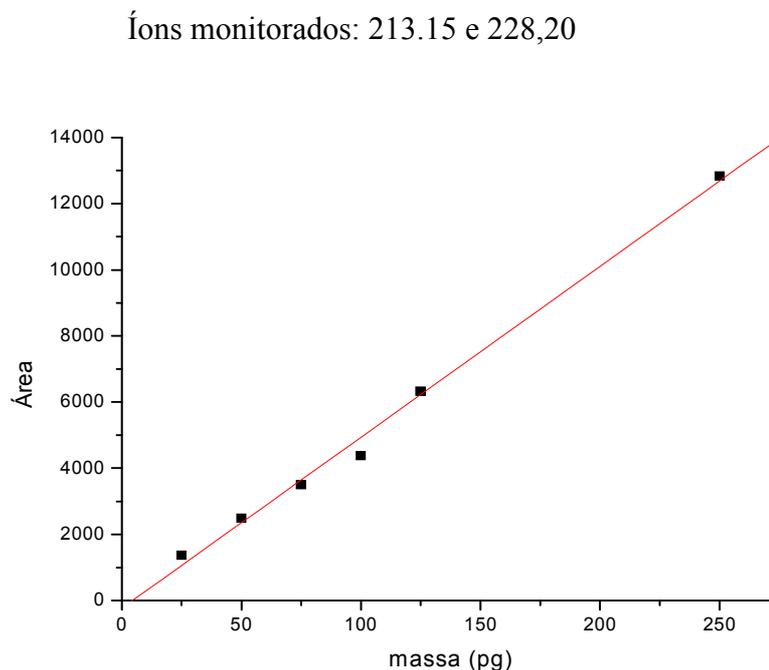


Figura 5.8. Curva analítica de BFA sem derivação.

5.2.3 Curva Analítica para o BFA derivado com TFAA

Foram preparadas e analisadas, em triplicatas, soluções padrão nas concentrações de 5, 10, 15, 25, 35, 50 $\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ para elaboração da curva analítica, para o BFA derivado com TFAA,

Exemplo de cromatograma obtido para o BFA no modo *SIM* nas concentrações utilizadas para a construção da curva analítica é apresentado na Figura 5.9.

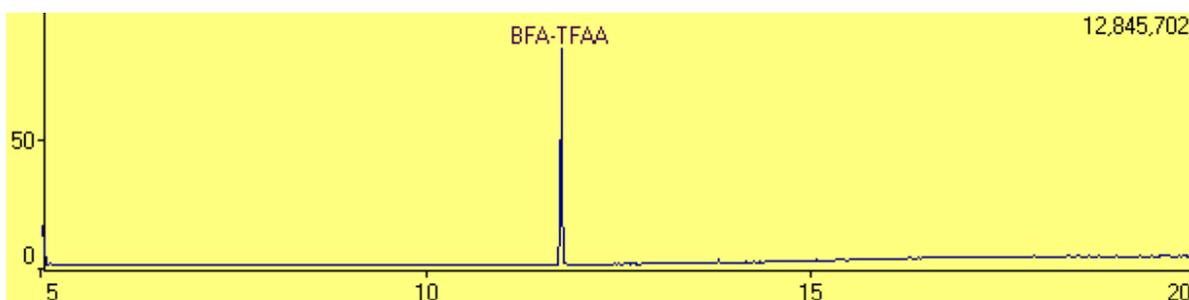


Figura 5.9. Cromatograma pela injeção de 1,0 μL de uma solução de BFA ($10,0 \text{ pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) derivado com TFAA.

A Figura 5.10 mostra a curva analítica do BFA derivado com TFAA.

Íons monitorados: 405,15; 406,10 e 420,10

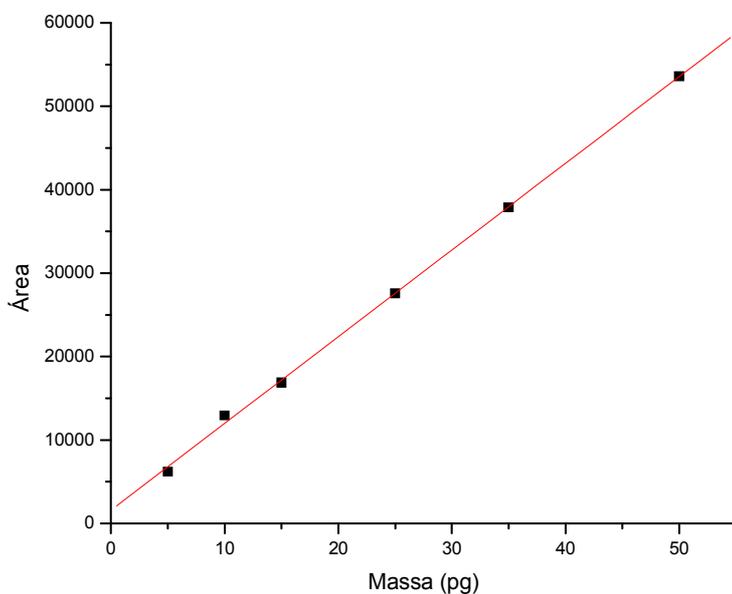


Figura 5.10. Curva analítica do BFA derivado com TFAA.

5.2.4 Curva Analítica para o BFA derivado com BSTFA

Na elaboração da curva analítica para o BFA derivado com BSTFA foram preparadas e analisadas em triplicatas, soluções padrões nas concentrações de 16, 32, 48, 80, 160 $\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ (ppb).

Exemplo de cromatograma obtido para o BFA no modo *SIM* nas concentrações utilizadas para a construção da curva analítica é apresentado na Figura 5.11.



Figura 5.11. Cromatograma obtido no modo *SIM* pela injeção de 1,0 μL de solução (80,0 $\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) padrão de BFA derivado com BSTFA.

A Figura 5.12 mostra a curva analítica do BFA derivado com BSTFA.

Íons monitorados: 357,30 e 372,30

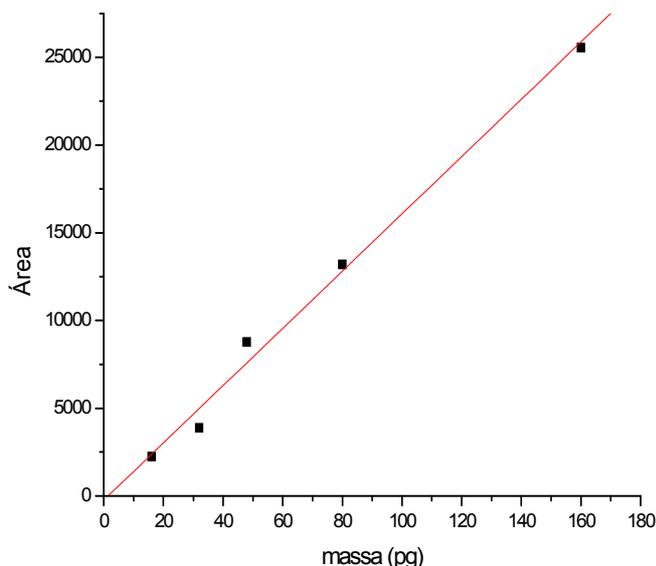


Figura 5.12. Curva analítica do BFA derivado com BSTFA.

5.2.5 Resumo das Equações de Retas e Coeficientes de Correlação Obtidos

As equações das retas e os coeficientes de correlação (R) obtidos estão apresentados na Tabela 5.3 a seguir.

Tabela 5.3. Equações das retas (y) e coeficientes de correlação (R) obtidos

Curva Analítica	Equação das Retas Obtidas ($y = a + bx$)	Coefficiente de Correlação (R)
BFA sem derivação	$y = -230,2 + 51,7x$	0,99718
BFA derivado com TFAA	$y = 1587,6 + 1039,4x$	0,99954
BFA derivado com BSTFA	$y = 236,5 + 163,1x$	0,99591

O melhor coeficiente de correlação obtido, bem próximo da unidade, foi com a derivação com TFAA, (R) > 0,999, conforme se nota na terceira coluna.

5.3 Validação da Metodologia

Para o estudo de recuperações, alíquotas de 500 mL das amostras em triplicatas, foram fortificadas com 5, 15 e 25 ng de BFA representando 1LQ, 3LQ e 5LQ. O procedimento analítico também foi realizado na amostra testemunha para garantir-se que a matriz estava isenta do analito. As amostras fortificadas foram deixadas em repouso por um período de 30 minutos para depois serem submetidas ao procedimento analítico com derivação com TFAA, visto ser a técnica que apresentou menores LD e LQ e também melhor coeficiente de correlação, $(R) > 0,999$.

5.3.1 Seletividade

Evidencia-se na análise dos cromatogramas das amostras do branco, da testemunha e do padrão BFA, apresentadas a seguir nas Figuras 5.13; 5.14 e 5.15, que no devido tempo de retenção (11,75 minutos) 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.

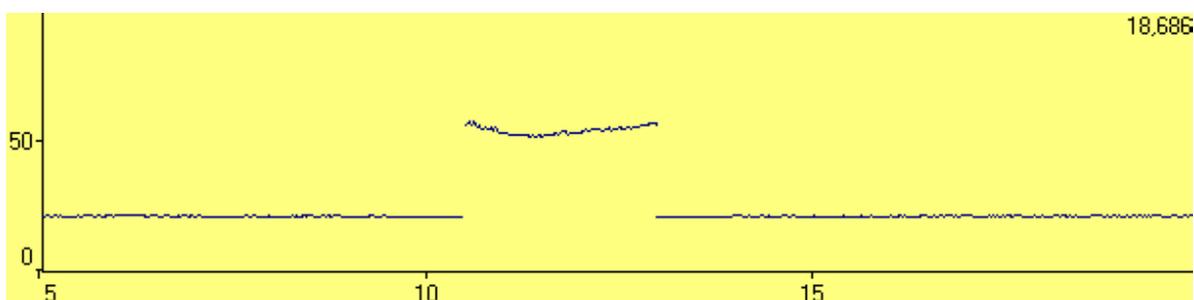


Figura 5.13. Cromatograma do branco.

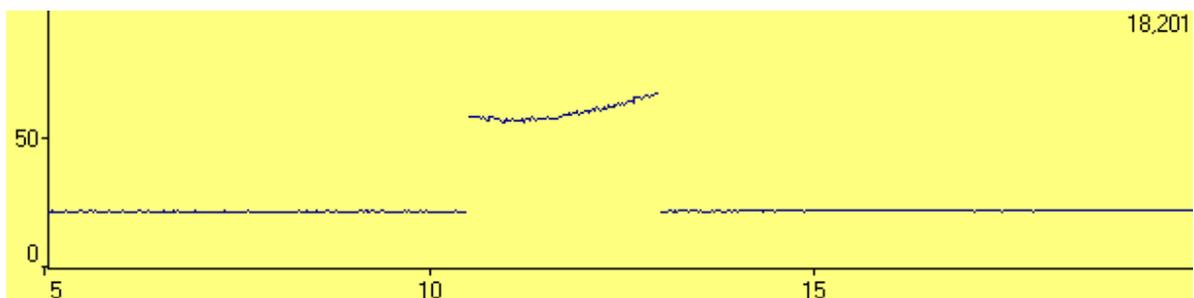


Figura 5.14. Cromatograma da amostra testemunha.

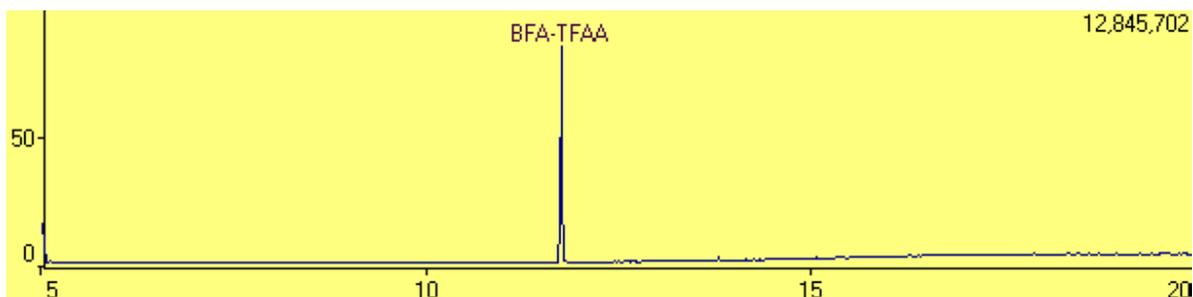


Figura 5.15. Cromatograma pela injeção de 1,0 μL de uma solução de BFA ($10,0 \text{ pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) derivado com TFAA.

5.3.2 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. A Tabela 5.3, apresentada anteriormente, mostra a boa linearidade das curvas, exarando os Coeficientes de Correlação (R); todos maiores de 0,99 e destacando especialmente a curva analítica do BFA com derivação com TFAA que apresentou (R) > 0,999, atendendo satisfatoriamente às recomendações da ANVISA (2003).

5.3.3 Ensaio de Recuperação

Ensaio 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.(%).

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

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

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

Onde: s = desvio padrão das recuperações e x = média das recuperações.

As análises cromatográficas apresentaram excelentes resultados, mostrados nas Figuras 5.16; 5.17; e 5.18, a seguir.

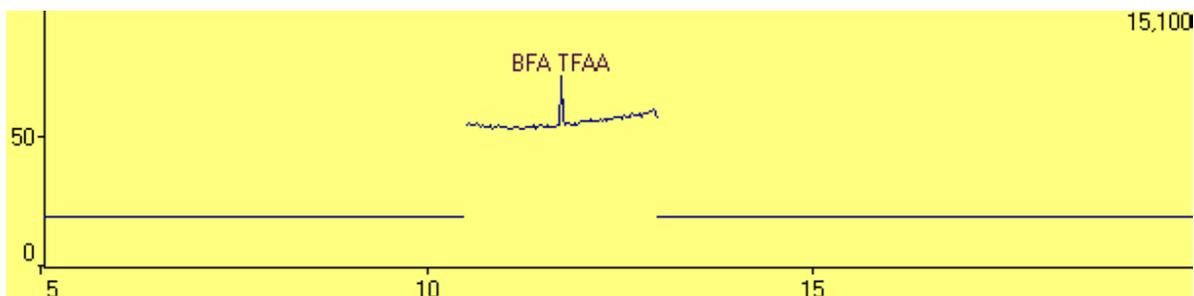


Figura 5.16. Cromatograma obtido dos ensaios de recuperação de uma amostra fortificada com $5,0 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (1LQ) de BFA.

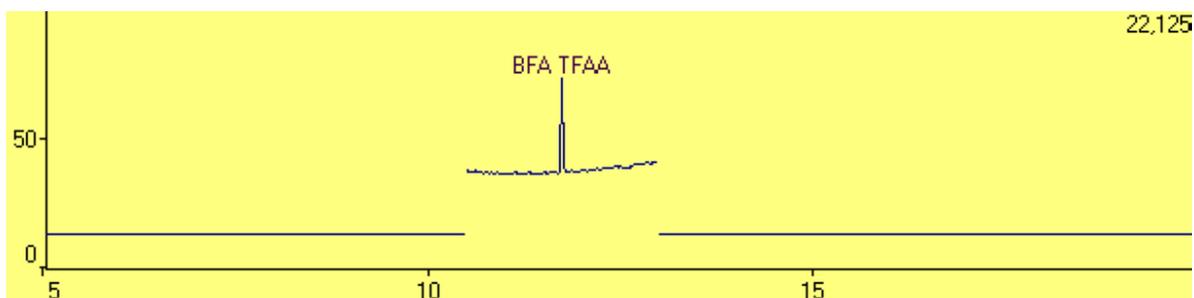


Figura 5.17. Cromatograma obtido dos ensaios de recuperação de uma amostra fortificada com $15,0 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (3LQ) de BFA.

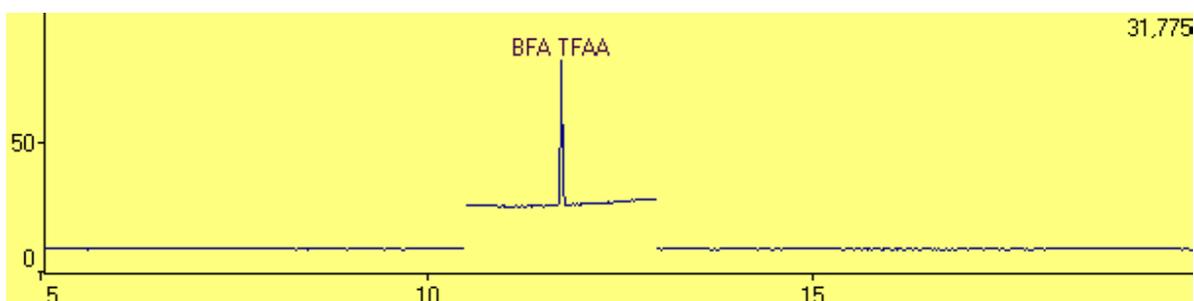


Figura 5.18. Cromatograma obtido dos ensaios de recuperação de uma amostra fortificada com $25,0 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (5LQ) de BFA.

As amostras fortificadas foram submetidas ao procedimento analítico com derivação com TFAA e os dados concernentes às análises são apresentados na Tabela 5.4 a seguir.

Tabela 5.4. Dados obtidos dos ensaios de recuperação referentes à análise de BFA em águas naturais

Limite de Quantificação	Massa adicionada (ng)	Área	Área Média	Desvio Padrão (s)	CV (%)	Massa recuperada (ng)	Recuperação (%)
1xLQ 5 pg. μL^{-1}	5	5869	5929	127	2,1	4,2	83
		5844					
		6075					
3xLQ 15 pg. μL^{-1}	15	14947	16055	1137	7,1	13,9	93
		17219					
		15998					
5xLQ 25 pg. μL^{-1}	25	30343	28910	1254	4,3	26,3	105
		28379					
		28009					

- OBS: a) A coluna “Limite de Quantificação” mostra a concentração desejada em relação ao LQ = 5pg/ μL ;
- b) A coluna “Massa adicionada (ng)” mostra a massa, em nanogramas, de padrão de BFA adicionada à matriz;
- c) A coluna “Área” mostra a área integrada do pico cromatográfico de cada amostra, em triplicata.
- d) A coluna CV (%) mostra os valores dos Coeficientes de Variação.
- e) A coluna “Massa recuperada (ng)” mostra a recuperação em massa, da massa adicionada, em nanogramas.
- f) A coluna “Recuperação (%)” mostra a recuperação da massa adicionada, em porcentagem.

5.3.3.1 Exatidão

Avalia-se a exatidão observando-se a porcentagem de recuperação. Na Tabela 5.4 nota-se que o método é considerado exato, já que as recuperações de todas as amostras (83%; 93% e 105%) estão dentro dos limites (70 – 120%), estabelecida pela literatura na área de análise de resíduos (Brito, *et al.*, 2003; ANVISA, 2003; Parker, 1991).

5.3.3.2 Precisão

Avaliou-se a precisão analisando-se os Coeficientes de Variação percentual, CV(%). Esses valores de CV(%) sofreram variação de 2,1% para amostras fortificadas com 1LQ de BFA; de 7,1% para amostras fortificadas com 3LQ de BFA e de 4,3% para amostras fortificadas com 5LQ; ficando com a média de variação de 4,5%, bem abaixo do limite recomendado pela literatura, que é de até 20% (ANVISA, 2003; Ribani, *et al.*, 2004), indicando que o método é preciso.

5.3.4 Análises das Amostras Reais de Águas Naturais

As amostras de águas naturais coletadas no Lago do Amor e no Córrego Cabaças no Campus da UFMS foram analisadas aplicando-se o método proposto, e os resultados obtidos enquadraram-se na curva analítica elaborada.

Na amostra coletada no Lago do Amor foram encontrados 22 pg.mL^{-1} de BFA e na amostra coletada no Córrego Cabaças foram encontrados $26,3 \text{ pg.mL}^{-1}$, conforme é mostrado na Tabela 5.5, na seqüência da apresentação dos resultados cromatográficos exibidos a seguir pelas Figuras 5.19; 5.20.

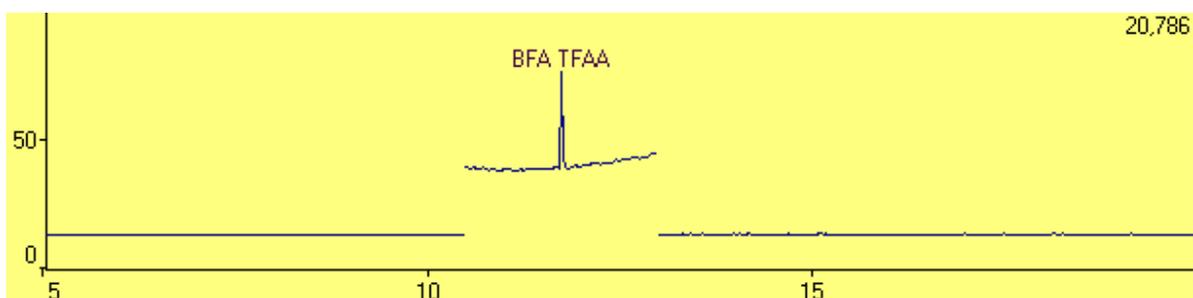


Figura 5.19. Cromatograma obtido da análise da amostra do Lago do Amor.

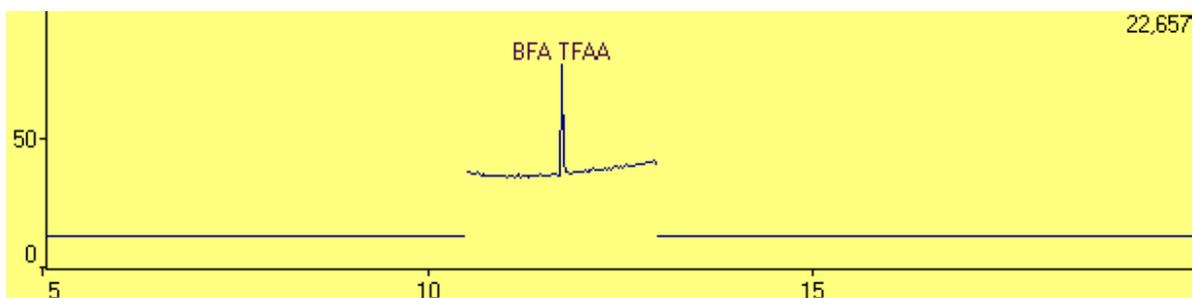


Figura 5.20. Cromatograma obtido da análise da amostra do Córrego Cabaças.

Evidencia-se a seletividade do método nesses resultados onde não aparecem picos cromatográficos de outros compostos na região do tempo de retenção (11,75 minutos) do BFA.

Os resultados das análises foram reunidos e apresentados na Tabela 5.5 a seguir.

Tabela 5.5. Resultado das análises cromatográficas de amostras reais na UFMS

Amostra Coletada	Área Média	Desvio Padrão (s)	CV (%)	Massa Determinada em 1 μ L em (pg)	Concentração de BFA na Amostra (pg.mL^{-1}) = ppt
Lago do Amor	13032	237	1,8	11,0	22,0
Córrego Cabaças	15233	395	2,6	13,1	26,3

Essas amostras foram coletadas em semana chuvosa, o que favoreceu a diluição da concentração de BFA encontrada, sugerindo que em épocas de estiagem encontraremos uma concentração maior.

Estudos mostram que em vários rios do Japão, as concentrações de BFA encontradas ficam na faixa de 39 a 58 pg.mL^{-1} , Kawahata (2004).

A resolução n.º 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA (2005) que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, nada diz com respeito ao BFA e a outros desreguladores endócrinos liberados no meio ambiente, mesmo sendo esses compostos extremamente danosos à espécie humana e ao meio ambiente.

CONAMA, (2005). Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA
Resolução n.º 357, de 17 de março de 2005.

6. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

6.1 Conclusões

Os resultados encontrados para a validação do método proposto apresentaram-se conforme os esperados pela literatura, e o processo de derivação, embora acrescentasse novas etapas ao método, mostrou-se muito vantajoso apresentando ótimos resultados nas análises.

O método de Extração em Fase Sólida (EFS) mostrou-se adequado e relativamente rápido, dependendo do grau de impureza das amostras, que necessitaram passar por filtração.

As metodologias de análise de BFA em amostras de águas naturais forneceram bons limites de detecção e quantificação (1,5 e 5,0 pg. μL^{-1} respectivamente), e a linearidade obtida das curvas analíticas foi excelente, apresentando valores do coeficiente de correlação maiores que 0,99, aproximando-se da unidade, destacando-se o alto grau de linearidade obtido pela análise do BFA com derivação com TFAA, que apresentou valor de $R > 0,999$.

O método proposto foi considerado seletivo, preciso e exato, haja vista as recuperações terem-se encontrado dentro da faixa de 70 – 120% e os valores de CV(%), em média de 4,5%, terem sido bem inferiores ao teto de 20% recomendado pela literatura.

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

6.2 Recomendações

Pela importância que representa o potencial de efeitos deletérios para a saúde humana a presença do BFA no meio ambiente, e nas águas em particular, recomenda-se que estudos de monitoramento sejam realizados nas águas naturais de Campo Grande/MS, principalmente nas proximidades das captações de água nos mananciais para o abastecimento da população. Estudos de desenvolvimento e validação de metodologias de análise de BFA em outras matrizes serão de grande importância para um futuro e indispensável controle desse contaminante.

Recomenda-se também que o CONAMA passe a considerar os contaminantes endócrinos, entre eles o BFA, como passíveis de controle, estabelecendo limites para os efluentes industriais que fazem chegar ao meio ambiente esses compostos extremamente danosos e sérios ameaçadores da reprodução das espécies e, principalmente das próprias reprodução e sobrevivência humanas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária: **Resolução RE n. 899 de 29/05/2003.**

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Monografias de produtos agropecuários:** atualizado em 10/05/2006. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/g01.pdf>.

AMARANTE JUNIOR; O. P. SANTOS, T. C. R.; BRITO, N. M.; RIBEIRO, M. L. **Glifosato: propriedade, toxicidade, usos e legislação.** Quimica Nova, v. 25, n. 4, p. 589-593, 2002a.

AMARANTE JUNIOR, O. P.; SANTOS, T. C. R.; BRITO, N. M.; RIBEIRO, M. L. **Métodos de extração e determinação do herbicida glifosato:** Breve Revisão. Quimica Nova, v. 25, n. 3, p. 420-428, 2002b.

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

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

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

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.

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 Pollut Bull, v. 48, p. 1145-1167, 2004.

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

BERKNER S.; STRECK, G.; HERRMANN, R. **Development and validation of a method for determination of traces levels of alkylphenols and bisphenol A in atmospheric samples.** Chemosphere, v. 54, p-575-584, 2004.

BILA, D.M.; DEZOTTI M. **Desreguladores Endócrinos no Meio Ambiente: Efeitos e Conseqüências.** Química Nova, v. 30, n. 3, p. 651-656, 2007.

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

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

BRITO, N. M.; AMARANTE JUNIOR, O. P.; POLESE, L.; SANTOS, T. C. R.; RIBEIRO, M. L. **Avaliação da exatidão e da precisão de métodos de análise de resíduos de pesticidas mediante ensaios de recuperação.** Pesticidas: R. Ecotox. e Meio Ambiente, v. 12, p. 155-168, 2002.

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

BROCK, J. W.; YOSHIMURA, Y.; BARR, J. R.; MAGGIO, V. L.; GRAISER, S. R.; NAKAZAWA, H.; NEEDHAM, L. L. **Measurement of bisphenol A levels in human urine.** J Expo Anal Environ Epidemiol, v. 11, p. 323-328, 2001.

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

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

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

EPA-Environmental Protection Agency. **EDSTAC conceptual framework.** Chapter three. Disponível em <<http://www.epa.gov/endo/pubs/edstac/chap3v14.pdf>>, 1998.

EURACHEM WORKING GROUP. **The fitness for purpose of analytical methods.** A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. Teddington, LGC Ltd, 54p.1998.

FELDMAN, D.; TOKES, L.; STATHIS, P. A.; MILLER, S. C.; KURZ, W.; HARVEY, D. **Identification of 17 β -estradiol as the estrogenic substance in Saccharomyces cerevisiae.** Proc Natl Acad Sci USA, v. 81, p. 4722-4726, 1984.

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

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

FURHACKER, M.; SCHARF, S.; WEBER, H. **Bisphenol A: emission from point sources.** Chemosphere, v. 41, c. 5, p. 751-756, 2000.

GATIDOU, G.; THOMAIDIS, N. S.; STASINAKIS, A. S.; LEKKAS, T. D. **Simultaneous determination of the endocrine disrupting compounds nonylphenol, nonylphenol ethoxylates, triclosan and bisphenol A in wastewater and sewage sludge by gas chromatography-mass spectrometry.** Journal of Chromatography A, v.1138, c. 1-2, p. 32-41, 2006.

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

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. **Interferentes endócrinos no ambiente.** Química Nova-On Line. Disponível em: <<http://quimicanova.s bq.org.br/qn/qnol/2007/vol30n3/index.htm>>, v.30, n. 3, p. 695-706, 2007.

GOLOUBKOVA, T.; SPRITZER, P. M. **Xenoestrogênios: o exemplo do bisfenol-A.** Arq Bras Endocrinol Metab, v. 44, p. 323-330, 2000.

GÓMEZ, M.; GARRALON, G.; PLAZA, F.; VÍLCHESZ, R. HONTORIA, E.; GÓMEZ, M. A. **Rejection of endocrine disrupting compounds (bisphenol A, bisphenol F and triethyleneglycol dimethacrylate) by membrane technologies.** Deslination, v. 212, p. 79-91, 2007.

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

GROSHART, C. P.; OKKERMAN, P. C.; PIJNENBURG, A. M. C. M. **Chemical study on bisphenol A.** Directoraat-Generaal Rijkswaterstaat. Disponível em <<http://www.rws.nl/rws/rikz/thema/ikc/rapport2001027.pdf>>, 2001.

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

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.** Occup Environ Med, v. 59, p. 625-628, 2002.

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

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.

HELALEH, 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.

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

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

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

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

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

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

INTERNATIONAL STUDIES ASSOCIATION. **37^a Convenção anual.** San Diego, California, 1996. Disponível em: <<http://www.nossofuturoroubado.com.br/ambiente.htm>>.

JANG, B. N.; WILKIE, C. A. **The thermal degradation of bisphenol A polycarbonate in air.** Thermochimica Acta, v. 426, p. 73-84, 2005.

JENSEN, T. K.; TOPPARI, J.; KEIDING, N.; SKAKKEBAEK, N. E. **Do environmental estrogens contribute to the decline in male reproductive health?** Clin Chem, 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.** Arch Environ Contam Toxicol, 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. **Bisphenol A degradation in river water is different from that in seawater.** Chemosphere, v. 60, p. 1288-1292, 2005.

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

KANG, J. H.; KONDO, F.; KATAYAMA, Y. **Importance of control of enzymatic degradation for determination of bisphenol A from fruits and vegetables.** Analytica Chimica Acta, v. 555, p. 114-117, 2006b.

KAWAGUCHI, M.; INOUE, K.; YOSHIMURA, M.; ITO, R.; SAKUI, N.; OKANOUCI, N.; NAKAZAWA, H. **Determination of bisphenol A in river water and body fluid samples by stir bar sorptive and extraction with in situ derivatization and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry.** Journal of Chromatography B, v. 805, p. 41-48, 2004a.

KAWAGUCHI, M.; INOUE, K.; YOSHIMURA, M.; SAKUI, N.; OKANOUCI, 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, 2004b.

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.

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.

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.

KERI, R. A.; HO, S.-M.; HUNT, P. A.; KNUDSEN, K. E.; SOTO, A. M.; PRINS, G. S. **An avaluation of evidence for the carcinogenic activity of bisphenol A.** Reproductive Toxicology, v. 24, p. 240-252, 2007.

KLEĚCKA, G. M.; GONSIOR, S. J.; WEST, R. J.; GOODWIN, P. A.; MARKHAM, D. A. **Biodegradation of bisphenol A in aquatic environments: river die-away.** Environ Toxicol Chem, v. 20, p. 2725-2735, 2001.

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

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.

LAGANÀ, A.; BACALONI, A.; LEVA, D. I.; FABERI, A.; FAGO, G.; MARINO, A. **Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemically in sewage treatment plants and natural waters.** *Analytical Chimica Acta*, v. 501, p. 79-88, 2004.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia em fase gasosa.** São Carlos: Ática, 1993.

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

LEE, J.; KIM, M.; KIM, B. **Photodegradation of bisphenol A with TiO₂ immobilized on the glass tubes including the UV light lamps.** *Water Research* 38, p. 3605-3613, 2004.

LEEPIPATPIBOON, N.; SAE-KHOW, O.; JAYANTA, S. **Simultaneous determination of bisphenol-A-diglycidyl ether, bisphenol-F-diglycidyl ether, and their derivatives in oil-in-water and aqueous-based canned foods by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection.** *Journal of Chromatography A*, v. 1073, p. 331-339, 2005.

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

LI, Z.; LI, D.; OH, J.; JE, J. **Seasonal and spatial distribution of nonylphenol in Shihwa Lake, Korea.** *Chemosphere*, v. 56, p. 611-618, 2004.

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.

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.

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

MARAGOU, N. C.; LAMPI, E. N.; THOMAIDIS, N. S.; KOUPPARIS, M. A. **Determination of bisphenol A in milk by solid phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry.** *Journal of Chromatography A*, v. 1129, c. 2, p. 165-173, 2006.

MARKEY, C. M.; RUBIN, B. S.; SOTO, A. M.; SONNENSCHNEIN, C. **Endocrine Disruptors: from Wingspread to Environmental Developmental Biology.** Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology, v. 83, p. 235-244, 2003.

MARCHESINI, G. R.; MEULENBERG, E.; HASSNOT, W.; IRTH, H. **Biosensor immunoassays for the detection of bisphenol A.** Analytica Chimica Acta, v. 528, p. 37-45, 2005.

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

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

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

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.

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

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

OUCHI, K.; WATANABE, S. **Measurement of bisphenol A in human urine using liquid chromatography with multi-channel coulometric electrochemical detection.** Journal of Chromatography B, v. 780, c. 2, p. 365-370, 2002.

PARKER, G. A. **Validation of methods used in the Florida department of agriculture and consumer services chemical residue laboratory.** JAOAC, v. 74, n. 5, p. 868-871, 1991.

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

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

REYS, L. P. **Tóxicos Ambientais Desreguladores do Sistema Endócrino.** RFML, v. 8, p.213-225, 2001.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos.** Quimica 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?** Frontiers in Bioscience, 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.** J Air Waste Manage Assoc, v. 51, p. 499-513, 2001.

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

SAUNDERS, P. T.; MAJDIC, G.; PARTE, P.; MILLAR, M. R.; FISHER, J. S.; TURNER, K. J.; SHARPE, R. M. **Fetal and perinatal influence of xenoestrogens on testis gene expression.** Adv Exp Med Biol, v. 424, p. 99-110, 1997.

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

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

SONNENSCHNEIN, C.; SOTO, A. M. **An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists.** J. Steroid Biochem Mol Biol, v. 65, n. 1-6, p.143-150, 1998.

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

STAPLES, C. A.; WILLIAMS, J. B.; BLESSING, R. L.; VARINEAU, P. T. **Measuring the biodegradability of nonylphenol ether carboxylates, octylphenol ether carboxylates, and nonylphenol.** Chemosphere, v. 38, n. 10, p. 2029-2039, 1999.

STEINMETZ, R.; MITCHNER, N. A.; GRANT, A.; ALLEN, D. L.; BIGSBY, R. M.; BEN-JONATHAN, N. **The xenostrogen bisphenol A induces growth, differentiation and c-fos gene expression in the female reproductive tract.** Endocrinology. V. 139, n. 6, p. 2741-2747, 1998.

STOCKER, C.; REY, F.; RODRIGUEZ, H.; RAMOS, J. G.; SIROSKY, P.; LARRIERA, A.; LUQUE, E. H.; TORO, M. M. D. **Sex reversal effects on Caiman latirostris exposed to environmentally relevant doses of the xenostrogen bisphenol A.** General and Comparative Endocrinology, 133, p. 287-296, 2003.

TAKEMURA, H.; MA, J.; SAYAMA, K.; TERAOKA, Y.; ZHU, B. T.; SHIMOI, K. **In vitro and in vivo estrogenic activity of chlorinated derivatives of bisphenol A.** Toxicology, v. 207, p. 215-221, 2005.

TANAKA, T.; TONOSAKI, T.; NOSE, M.; TOMIDOKORO, N.; KADOMURA, N.; FUJII, T.; TANIGUCHI, M. **Treatment of model soils contaminated with phenolic endocrine-disrupting chemicals with laccase from trametes sp. In a rotating reactor.** Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 92, n. 4, p. 312-316, 2001.

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

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

VANDENBERG, L. N.; HAUSER, R.; MARCUS, M.; OLEA, N.; WELSHONS, W. V.; **Review-Human exposure to bisphenol A (BPA).** Reproductive Toxicology, v. 24, p. 139-177, 2007.

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.

YING, G. G.; KOOKANA, R. S. **Degradation of five selected endocrine-disrupting chemicals in seawater and marine sediment.** Environ Sci Technol, v. 37, p. 1256-1260, 2003.

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

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

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

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

ZAFRA-GÓMEZ, A.; BALLESTEROS, O.; NAVALÓN, A.; VÍLCHEZ, J. L. **Determination of some endocrine disrupter chemicals in urban wastewater samples, using liquid chromatography-mass spectrometry.** *Microchemical Journal*, v. 88, p. 87-94, 2008.

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

ZHOU, D.; WU, F.; DENG, N.; XIANG, W. **Photooxidation of bisphenol A (BPA) in water in the presence of ferric and carboxylate salts.** *Water Research* 38, p. 4107-4116, 2004.

APÊNDICES

Mapas dos Locais das Coletas de Águas Naturais

Local das Amostras Coletadas no Lago do Amor



Local das Amostras Coletadas no Córrego Cabaças

