

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA  
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Patrícia dos Santos Souza

**AVALIAÇÃO DO TEOR DE BISFENOL A EM LEITE FLUIDO E LEITE EM PÓ  
UTILIZANDO TRATAMENTO QuEChERS E ANÁLISE POR CLUE-EM/EM**

Rio de Janeiro

2019

Patrícia dos Santos Souza

AVALIAÇÃO DO TEOR DE BISFENOL A EM LEITE FLUIDO E LEITE EM PÓ  
UTILIZANDO TRATAMENTO QuEChERS E ANÁLISE POR CLUE-EM/EM

Tese apresentada ao curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Shirley de Mello Pereira Abrantes  
Co-orientador: André Victor Sartori

Rio de Janeiro

2019

## Catálogo na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Souza, Patrícia dos Santos

Avaliação do teor de bisfenol A em leite fluido e leite em pó utilizando tratamento QuEChERS e análise por CLUE-EM/EM. / Patrícia dos Santos Souza. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2019.

114 f. : il. ; fig. ; graf. ; tab.

Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2019.

Orientadora: Shirley de Mello Pereira Abrantes.

Co-orientador: André Victor Sartori.

1. Substitutos do Leite Humano. 2. Cromatografia Líquida. 3. Espectrometria de Massas. 4. Contaminação de Alimentos. 5. Exposição dietética. I. Título.

Evaluation of bisphenol A content in fluid milk and milk powder using QUEChERS treatment and UHPLC-MS/MS analysis.

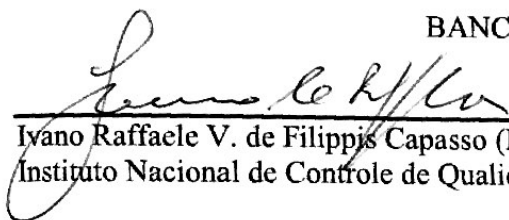
Patrícia dos Santos Souza

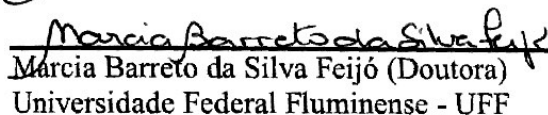
**AVALIAÇÃO DO TEOR DE BISFENOL A EM LEITE FLUIDO E LEITE EM PÓ  
UTILIZANDO TRATAMENTO QuEChERS E ANÁLISE POR CLUE-EM/EM**

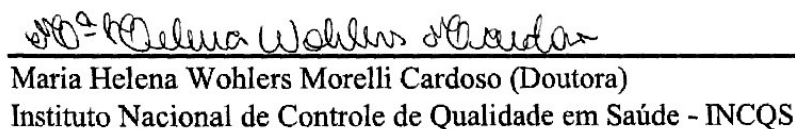
Tese apresentada ao curso de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências.

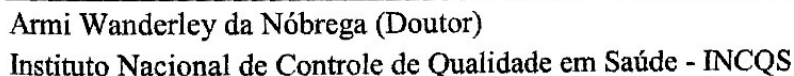
Aprovado em: 30/08/2019.

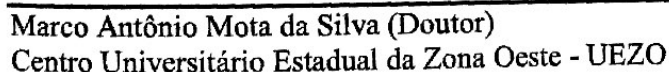
BANCA EXAMINADORA

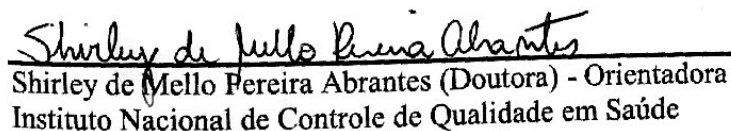
  
Ivano Raffaele V. de Filippis Capasso (Doutor)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS

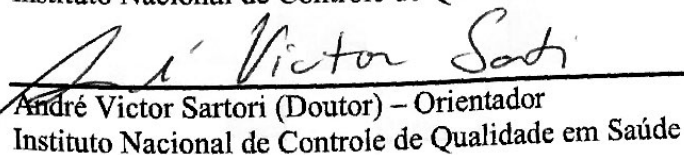
  
Marcia Barreto da Silva Feijó (Doutora)  
Universidade Federal Fluminense - UFF

  
Maria Helena Wohlers Morelli Cardoso (Doutora)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS

  
Armi Wanderley da Nóbrega (Doutor)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS

  
Marco Antônio Mota da Silva (Doutor)  
Centro Universitário Estadual da Zona Oeste - UEZO

  
Shirley de Mello Pereira Abrantes (Doutora) - Orientadora  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

  
André Victor Sartori (Doutor) - Orientador  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Dedico este trabalho a minha família que me incentivou e apoiou nos momentos mais difíceis.

## AGRADECIMENTOS

Ao Deus da minha vida que me deu forças para avançar, prosseguir e continuar acreditando mesmo quando tudo parecia impossível.

À minha incrível família que me ajudou a ver as cores do arco-íris em dias nublados. Obrigada por vocês estarem presentes mesmo quando eu estive ausente. Amo vocês!

Aos meus pais, Ângela e Manoel, pelas orações, pelo amor, pela paciência, pelo incentivo diário e por sempre acreditarem que eu chegaria lá.

Às minhas irmãs, Paula e Priscila, pelo apoio incondicional, pela paciência, pelas palavras que aqueceram minha alma e me fizeram prosseguir diante de tamanho desafio. Vocês são as minhas pessoas preferidas no mundo!

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Shirley de Mello Pereira Abrantes, por ter aberto as portas do INCQS/FIOCRUZ para mim, pelo incentivo, pelo conhecimento compartilhado, pela paciência durante todo esse período. Nunca esquecerei toda a ajuda e sempre serei grata por ter me orientado e ficado até o fim.

Ao Thomas Manfred Krauss, que aceitou o desafio em me orientar mesmo sem nenhuma obrigação. Obrigada pela orientação incansável, pela paciência, pelos conhecimentos compartilhados diariamente, por ter estado comigo durante todos esses meses e não ter soltado minhas mãos durante as fases mais difíceis.

Ao André Victor Sartori a quem serei eternamente grata por ter me enxergado no meio dos corredores do INCQS. Obrigada por ter entrado nesse projeto comigo, por ter me orientado, dedicado seu tempo e compartilhado seus conhecimentos. Muito obrigada por me ajudar a tornar esse sonho possível.

Ao Fábio Silvestre Bazílio por toda ajuda e palavras de incentivo ao longo dessa caminhada.

Aos meus amigos que direta ou indiretamente me ajudaram a permanecer firme e avançar. Em especial ao meu grupo M.P, que me apoiou, riu e se preocupou comigo. Vocês foram o vento suave em dias cinzentos. Obrigada Carla, Mariana e Cinthia.

À minha sócia, Ana Carolina Valle, que teve paciência, acreditou em mim e seguiu nosso sonho mais um pouco. Parceira, nunca esquecerei seu carinho e zelo comigo.

À Coordenação do PPGVS do INCQS por toda ajuda e compreensão durante todos esses anos.

Mudanças pequenas e progressivas podem  
levar a alterações dramáticas.

Joistein Gaarder

## RESUMO

O bisfenol A, considerado um importante disruptor endócrino, é uma substância utilizada na fabricação de diversos materiais, incluindo embalagens utilizadas para acondicionar alimentos. A ingestão de alimentos contaminados tem sido considerada a forma mais relevante de exposição a essa substância. Ainda são escassas informações sobre a presença desse contaminante em leite no Brasil. Assim, o presente trabalho teve como principal objetivo avaliar a contaminação de leite por bisfenol A em amostras de leite da região metropolitana do Rio de Janeiro. Foi otimizado um método analítico para a determinação de bisfenol A em leite pasteurizado e ultra alta temperatura (UAT) e em leite em pó. Para o tratamento das amostras foi utilizado um método QuEChERS (*Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe*) modificado e a determinação do bisfenol A pela técnica de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLUE-EM/EM). O método de tratamento de amostras envolve apenas uma etapa simultânea de particionamento / limpeza e foi considerado adequado para ser aplicado em análises de rotina podendo contribuir com as autoridades de saúde pública para controle de bisfenol A em alimentos. O método foi seletivo para bisfenol A em todos os tipos de leite estudados. As curvas de calibração foram estatisticamente lineares, não sendo observada falta de ajuste ao modelo. O método não apresentou efeito matriz e, portanto, curvas de calibração preparadas em solvente podem ser utilizadas nas análises de rotina. O método apresentou exatidão satisfatória com valores de recuperação entre 71 e 94%. Os valores de desvio padrão relativo obtidos nos estudos de repetibilidade (11%) e precisão intermediária (4,8%) também foram considerados satisfatórios (valores de  $HorRat_r$  e  $HorRat_R$  inferiores a 2). Os limites de detecção e quantificação do analito foram de 0,12 ng/mL e 0,36 ng/mL (leite em pó reconstituído (1:10) e leite fluído), respectivamente, e a sensibilidade do método analítico foi considerada adequada ao propósito do estudo. O método validado foi aplicado na investigação dos níveis de contaminação por bisfenol A em 51 amostras de leite adquiridas no mercado da região metropolitana do Rio de Janeiro. Do total de amostras analisadas, o bisfenol A foi detectado em cinco (9,8%) e quantificado em duas (3,8%). A ingestão diária estimada do bisfenol A para crianças até 12 meses variou de 24,95 a 97,72 ng/kg de peso corporal/dia, sendo inferior ao valor da ingestão diária tolerável.

Palavras-chave: Bisfenol A. CLUE-EM/EM. QuEChERS. Leite bovino. Avaliação da exposição dietética.



## ABSTRACT

Bisphenol A, considered an important endocrine disruptor, is a substance used in the manufacture of many materials, including packaging used for packaging food. The Ingestion of contaminated food has been considered the most relevant form of exposure to this substance. There is still little information about the presence of this contaminant in milk in Brazil. That way, the present work aimed to evaluate the contamination of milk by bisphenol A in milk samples from the metropolitan region of Rio de Janeiro. An analytical method for the optimization of bisphenol A in ultra high temperature and pasteurized milk (UAT) and in milk powder was developed. For the treatment of the samples a modified QuEChERS method (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) was used and the determination of bisphenol A by the technique of ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). The sample treatment method involves only one simultaneous partitioning/cleaning step and was found to be suitable for routine analysis and may contribute to public health authorities to control bisphenol A in food. The method was selective for bisphenol A in all types of milk studied. The method had no matrix effects and therefore solvent prepared calibration curves can be used for routine analysis. The method presented satisfactory accuracy with recovery values between 78 and 94%. Relative standard deviation values obtained in the repeatability (11%) and intermediate precision (4.8%) studies were also considered satisfactory (*HorRat<sub>r</sub>* and *HorRat<sub>R</sub>* values less than 2). The limits of detection and quantitation of the analyte were 0.12 ng/mL and 0.36 ng/mL (reconstituted milk powder (1:10) and fluid milk), respectively, and the sensitivity of the analytical method was considered adequate for purpose of the study. The validated method was applied to the investigation of bisphenol A contamination levels in 51 milk samples acquired in the market of the metropolitan region of Rio de Janeiro. Of the total samples analyzed, bisphenol A was detected in five samples (9,8%) and quantified in two (3,8%) samples. The estimated daily ingestion of bisphenol A for children up to 12 months ranged from 24.95 to 97.72 ng / kg body weight / day, which is lower than the tolerable daily intake value.

Key-words: Bisphenol A. UHPLC-MS/MS. QuEChERS. Cow's milk. Dietary exposure assessment.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema dos potenciais mecanismos de ação do bisfenol A (BFA) no desenvolvimento da obesidade .....	22
Figura 2 - Desenho esquemático dos receptores de membrana celular .....	23
Figura 3 - Esquema de ação dos receptores intracelulares .....	24
Figura 4 - Esquema da reação de formação de bisfenol A .....	26
Figura 5 - Estrutura química do policarbonato de bisfenol A (a) e da resina epóxi (b) .....	27
Figura 6 - Esquema de biotransformação do bisfenol A (1) em bisfenol A-glicurônico (2) e bisfenol A-sulfato (3), em roedores e humanos .....	29
Figura 7 - Diferentes materiais de embalagem para leite .....	36
Figura 8 - Desenho esquemático do fluxograma das operações associadas ao beneficiamento do leite .....	43
Figura 9 - Desenho esquemático da cadeia de suprimento do leite .....	46
Figura 10 - Exposição humana ao leite e seus derivados contaminados por bisfenol A ao longo da cadeia produtiva .....	48
Figura 11 - Desenho esquemático do método para determinação de bisfenol A em amostras (a) de leite fluido integral (UAT e pasteurização) e (b) leite em pó integral .....	62
Figura 12 - Cromatograma da ausência de efeito memória ( <i>carryover</i> ). (a) Cromatograma de solução padrão 5 ng/mL de bisfenol A em matriz. (b) Cromatograma da injeção de metanol imediatamente após a análise da solução de bisfenol A a 5 ng/mL. ....	73
Figura 13 - Cromatograma do efeito da ausência de limpeza do sistema cromatográfico no final da corrida, no nível de 5 ng/mL de bisfenol A em matriz .....	74
Figura 14 - Cromatograma demonstra a resposta da etapa de clean-up do extrato com 50 mg de C <sub>18</sub> e 50 mg de PSA, mantidas as mesmas condições cromatográficas, em nível de 50 ng/mL de bisfenol A .....	74
Figura 15 - Injeção em triplicata de padrão de 5 ng/mL de bisfenol A (em matriz) aplicando a limpeza do sistema cromatográfico no final da corrida com solvente ACN:MeOH:isopropanol:H <sub>2</sub> O (1:1:1:1, v/v/v/v) .....	75
Figura 16 - Cromatogramas demonstram a influência da adição de hidróxido de amônio 0,1% no solvente final utilizado na ressuspensão, no nível de 1 ng/mL de bisfenol A em matriz. (a) Cromatograma de 1 ng/mL de bisfenol A em matriz com adição de hidróxido de amônio 0,1% no solvente final utilizado na ressuspensão e (b)	

Cromatograma de 1 ng/mL de bisfenol A em matriz sem adição de hidróxido de amônio 0,1% no solvente final utilizado na ressuspensão .....	77
Figura 17 - Cromatogramas da migração de bisfenol A dos êmbolos de seringas descartáveis. ....	78
Figura 18 - Cromatogramas demonstrando ausência de interferentes no tempo de retenção do bisfenol A ( $t_R$ 1,35 minutos). a) amostra de leite em pó integral reconstituída (1:10) fortificada com bisfenol A (0,5 ng/mL) e b) amostra de leite em pó integral reconstituída (1:10) não fortificada .....	80
Figura 19 - Cromatograma demonstra a avaliação da recuperação do método ao longo das bateladas usando uma mostra de leite em pó integral reconstituída (1:10) fortificada com uma concentração de 0,5 ng/mL de bisfenol A (n = 3). a) Cromatograma de leite em pó integral reconstituído (1:10) fortificado com uma concentração de 0,5 ng/mL de bisfenol A (n = 3); b) Cromatograma de solução de bisfenol A na concentração de 0,5 ng/mL de bisfenol A (n = 3). ....	89
Figura 20 - Cromatogramas demonstrando ausência de contaminação nos reagentes/solventes utilizados nas análises de rotina. a, b, c) branco de método analisado nas bateladas das amostras comparado com d) amostra controle (0,5 ng/mL de bisfenol A) .....	90
Figura 21 - Cromatograma da amostra de leite em pó reconstituída (1:10) naturalmente contaminada por bisfenol A (0,53 ng/mL) .....	91

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Produção de leite no Brasil de 1961 a 2015 .....	42
Gráfico 2 - Percentual dos diferentes tipos de leites analisados .....	68
Gráfico 3 - Categoria das embalagens das amostras de leite analisadas .....	69
Gráfico 4 – Avaliação dos diferentes sistemas de fase móvel testadas no ensaio preliminar das condições de análise, no nível de 50 ng/mL de bisfenol A em matriz. Condições de análise: sistema de eluição isocrático; fluxo de 0,3 mL/min; temperatura do forno da coluna 35°C; volume de injeção de 5 µL .....	72
Gráfico 5 - Gráficos comparativos entre as curvas analíticas preparadas na presença do solvente (azul) e da matriz (vermelha) para bisfenol A .....	82
Gráfico 6 - Curva analítica final de bisfenol A em solvente .....	83
Gráfico 7 - Gráfico de Durbin-Watson ( $e_i \times e_{i-1}$ ), curva de bisfenol A em solvente .....	84

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exposição ao bisfenol A e efeitos em humanos .....	31
Tabela 2 - Métodos analíticos para determinação de bisfenol A em alimentos .....	39
Tabela 3 - Características físico-químicas do leite cru (%), segundo RIISPOA .....	45
Tabela 4 - Avaliação da homoscedasticidade entre as variâncias dos resíduos das duas curvas .....	81
Tabela 5 - Comparação das inclinações e interseções das curvas .....	81
Tabela 6 - Normalidade dos resíduos da regressão (teste de Ryan-Joiner) .....	83
Tabela 7 - Homoscedasticidade dos resíduos da regressão (teste de Levene).....	84
Tabela 8 - Independência dos resíduos da regressão (teste de Durbin-Watson) .....	84
Tabela 9 - Análise de variância para significância da regressão e do desvio da linearidade do bisfenol A em solvente .....	85
Tabela 10 - Limites de Detecção e de Quantificação calculados a partir de leite em pó integral reconstituído (1:10), no nível de 0,5 ng/mL de bisfenol A .....	86
Tabela 11 - Avaliação da Repetibilidade do bisfenol A para leite em pó integral reconstituído (1:10) fortificado no nível de 0,5 ng/mL de bisfenol A .....	87
Tabela 12 - Avaliação da Precisão Intermediária do bisfenol A para leite em pó integral reconstituído (1:10) fortificado no nível de 0,5 ng/mL de bisfenol A (n=3) .....	88
Tabela 13 - Valores da ingestão diária estimada (ng/kg/PC/dia) para crianças até 12 meses de vida, considerando um cenário de uso exclusivo do leite em pó integral reconstituído contaminado naturalmente por bisfenol A (0,53 ng/mL) .....	94

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACN	Acetonitrila
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
APCI	Ionização Química à Pressão Atmosférica
APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
BFA	Bisfenol A
BPA	Boas Práticas Agrícolas
BSTFA	<i>N-O-Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida</i>
C <sub>18</sub>	Octadecilsiloxano
CBT	Contagem Bacteriana Total
CCS	Contagem de Células Somáticas
CDC	Centro para Prevenção e Controle de Doenças
CG	Cromatografia Gasosa
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
CLAE-DE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector Eletroquímico
CLAE-EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a Espectrometria de Massas
CLAE-FL	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a fluorescência
<i>CLARITY-BPA</i>	<i>Consortium Linking Academic and Regulatory Insights on BPA Toxicity</i>
CLUE	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
CV	Coefficiente de Variação
DCNT	Doenças Crônicas Não Transmissíveis
DIB-Cl	4-(4,5-Difenil-Imidazol-2-il) Cloreto de Benzofila
dm <sup>2</sup>	Decímetros Quadrados
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPR	Desvio Padrão Relativo
D-SPE	Extração em Fase Sólida Dispersiva - <i>Dispersive Solid Phase Extraction</i>
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos

ECF-SPME-CG-EM	Microextração por fase sólida no <i>headspace</i> combinado com cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massa com derivatização.
EFS	Extração em Fase Sólida
EFSA	Autoridade Europeia para Segurança Alimentar - <i>European Food Safety Authority</i>
EFS-CG-EM	Extração em Fase Sólida Combinado com Cromatografia Casosa Acoplada à Espectrometria de Massas
ELL	Extração em Solventes (líquido-líquido)
EM/EM	Espectrometria de Massas Sequencial
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ESI	<i>Eletrospray</i> por Íons Negativos
EU	União Europeia
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura
FIESP	Federação das Indústrias do Estado de São Paulo
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
g	Grama
H <sub>0</sub>	Hipótese nula
H <sub>2</sub> O	Água
HAP	Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos
HLB	Hidrofílica-Lipofílica
HS-SPME-CG-EM	Microextração por Fase Sólida no <i>Headspace</i> Combinado com Cromatografia a Gás Acoplada à Espectrometria de Massa
IAE-CLAE-FL	Extração por imunoafinidade Coluna de imunoafinidade combinado com cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à fluorescência
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDA	Ingestão Diária Aceitável
IMC	Índice de Massa Corporal
IN	Instrução Normativa
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
kg	Quilograma

Kow	Coeficiente de Partição octanol/água
L	Litro
LME	Limite de Migração Específica
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
m/z	Relação Massa / Carga
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MeOH	Metanol
mg	Miligrama
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de Magnésio
mL	Mililitro
MMQO	Método dos Mínimos Quadrados Ordinários
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>
MS	Ministério da Saúde
N <sub>2</sub>	Nitrogênio
NaCl	Cloreto de Sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanograma
NOAEL	Nível Sem Efeitos Adversos Observados - <i>No-Observed Adverse Effect Level</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAC	Programa de Autocontrole
PAMVet	Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos
PC	Peso Corpóreo
PCB	Bifenilas Policloradas
PE	Polietileno
PET	Poli(tereftalato de etileno)
pH	Potencial Hidrogeniônico
PNCRC	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
POF	Pesquisa de Orçamentos Familiares
PSA	Amina Primária-Secundária - <i>Primary Secondary Amine</i>
PTFE	Politetrafluoroetileno
PVC	Poli(cloreto de vinila)



PVDC	Poli(cloreto de vinilideno)
QuEChERS	<i>Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe</i>
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RE	Receptores de Estrógeno
RIISPOA	Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
Sol-gel IAE-CLAE-FL	Coluna Sol-Gel de Imunoafinidade Combinado com Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada à Fluorescência.
TIC	Cromatograma Total de Íons
$t_R$	Tempo de Retenção
U.S. NTP	Programa Nacional de Toxicologia - <i>National Toxicology Program</i>
U.S.EPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos - <i>United States Environmental Protection Agency</i>
UAT/UHT	Ultra Alta Temperatura/Ultra High Temperature
USDA	Departamento de Agricultura dos Estados Unidos - <i>United States Department of Agriculture</i>
VIGITEL	Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico
°H	Grau Hortvet
$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{m}$	Micrometro

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>1.1 Obesidade</b> .....	19
<b>1.2 Disruptores / Interferentes / Desreguladores endócrinos</b> .....	22
<b>1.3 Química do bisfenol A</b> .....	26
<b>1.4 Aspectos toxicológicos do bisfenol A</b> .....	28
<b>1.5 Exposição</b> .....	32
<b>1.6 Migração</b> .....	33
<b>1.7 Embalagem de leite</b> .....	35
<b>1.8 Aspectos legais</b> .....	37
<b>1.9 Métodos analíticos</b> .....	39
<b>1.10 Leite</b> .....	42
<b>1.11 Cadeia de suprimento de laticínios e ocorrência de bisfenol A</b> .....	46
<b>1.12 Validação</b> .....	48
1.12.1 Seletividade.....	48
1.12.2 Linearidade .....	49
1.12.3 Faixa de trabalho.....	49
1.12.4 Efeito matriz .....	49
1.12.5 Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) .....	50
1.12.6 Tendência/Exatidão .....	50
1.12.7 Precisão .....	50
<b>1.13 Vigilância Sanitária</b> .....	51
<b>1.14 Justificativa</b> .....	52
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	54
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	54
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	54
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	55
<b>3.1 Otimização das condições CLUE-EM/EM</b> .....	58
<b>3.2 Otimização das condições de tratamento da amostra</b> .....	59
<b>3.3 Tratamento do material utilizado para eliminação de contaminantes</b> .....	59
<b>3.4 Condições instrumentais</b> .....	60
<b>3.5 Preparo das amostras</b> .....	60
<b>3.6 Validação do método</b> .....	62

3.6.1 Seletividade.....	62
3.6.2 Linearidade .....	63
3.6.3 Faixa de trabalho.....	65
3.6.4 Efeito matriz .....	65
3.6.5 Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) .....	66
3.6.6 Tendência/Exatidão .....	66
3.6.7 Precisão .....	67
<b>3.7 Amostras analisadas .....</b>	<b>67</b>
<b>3.8 Avaliação da exposição ao bisfenol A.....</b>	<b>69</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>71</b>
<b>4.1 Desenvolvimento do método analítico.....</b>	<b>71</b>
<b>4.2 Otimização das condições de tratamento da amostra .....</b>	<b>76</b>
<b>4.3 Validação do método analítico.....</b>	<b>79</b>
4.3.1 Seletividade.....	79
4.3.2 Efeito matriz .....	80
4.3.3 Linearidade .....	82
4.3.4 Faixa de trabalho.....	85
4.3.5 Limites de detecção e quantificação .....	86
4.3.6 Tendência/Exatidão .....	86
4.3.7 Precisão .....	87
<b>4.4 Controle de Qualidade Interno.....</b>	<b>88</b>
<b>4.5 Amostras analisadas .....</b>	<b>90</b>
<b>4.6 Avaliação da exposição ao bisfenol A.....</b>	<b>93</b>
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>96</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>98</b>
<b>APÊNDICE A – RELAÇÃO DAS AMOSTRAS DE LEITE FLUIDO INTEGRAL E LEITE EM PÓ INTEGRAL ANALISADAS .....</b>	<b>114</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de produtos químicos sintéticos no último século ocorreu de forma exponencial. A produção e uso crescente deles e a inexistência de políticas de controle baseados em critérios toxicológicos e ambientais têm levado ao aparecimento de inúmeras substâncias químicas de uso industrial, agrícola e doméstico envolvidos na teratogenicidade e carcinogenicidade em seres humanos (FONTENELE *et al.*, 2010; STAPLES *et al.*, 1998). Os contaminantes químicos presentes em alimentos têm recebido atenção dos órgãos de saúde pública, particularmente àqueles envolvidos com intoxicações crônicas provenientes de exposições prolongadas a baixas concentrações, dentre eles se destaca o bisfenol A (BFA) (ALVES *et al.*, 2007; HEINDEL, 2008; SODRÉ *et al.*, 2007).

O bisfenol A é uma substância química utilizada principalmente na confecção de plásticos policarbonatos resistentes e resinas epóxi para revestimento de embalagens metálicas de alimentos e bebidas. Em geral, alimentos são considerados como a fonte predominante de bisfenol A, pois a partir do contato do alimento com embalagens plásticas e metálicas pode ocorrer à migração da substância da embalagem para os alimentos. Alterações nas embalagens ocasionadas por mudança de temperatura ou pH são suficientes para que isso aconteça. Estudos têm mostrado que mesmo diante da migração na ordem de traço há risco à saúde humana (BATISTA *et al.*, 2012; CARWILE; MICHELS, 2011; TRASANDE; ATTINA; BLUSTEIN, 2012).

Foram encontrados bisfenol A em uma variedade de amostras desde produtos de origem animal (leite, produtos lácteos, ovos, pescados e carnes) a outros alimentos (óleos vegetais, cereais, *snacks*, produtos de soja e enlatados) (LIAO; KANNAN, 2013, 2014). Dados da pesquisa trimestral do leite (cru, resfriado ou não, adquirido e industrializado) apresentados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) mostraram que no primeiro trimestre de 2018 o volume de leite captado pelos laticínios brasileiros totalizou mais de 6 bilhões de litros (IBGE, 2018). Dessa forma, o leite é um alimento amplamente consumido pela população além de servir de matéria-prima para a produção de inúmeros outros produtos, portanto a contaminação dele pode representar um risco para a saúde humana (TSAKIRIS *et al.*, 2013).

A partir do conhecimento sobre os efeitos adversos do bisfenol A, vários países vêm tomando medidas de segurança a fim de limitar a exposição da substância aos indivíduos, assim como pesquisadores têm desenvolvido novos métodos analíticos com o objetivo de determinar bisfenol A nos diferentes alimentos, podendo assim contribuir para avaliar o nível

de exposição que a população esteja sujeita. Porém, a maioria dos métodos é dispendiosa e demorada, por isso novas técnicas têm sido desenvolvidas objetivando tornar o método mais sensível, seletivo, econômico e rápido (BALLESTEROS-GÓMES; RUBIO; PÉREZ-BENDITO, 2009).

A cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLUE-EM/EM) combina as vantagens da cromatografia (separação eficiente e elevada seletividade) e da espectrometria de massas (detectabilidade, massa molar e informação estrutural), sendo a espectrometria de massas sequencial considerada ainda uma ferramenta de identificação e confirmação. Portanto, reduz a necessidade de etapas excessivas de preparo de amostra, além de contribuir com a diminuição dos resultados falsos positivo e/ou negativo em amostras complexas, permitindo a identificação de analitos em níveis de ultratraços. A adição do método QuEChERS (*Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe*) permite que o *clean-up* de interferentes e a redução de água residual sejam efetuados de forma rápida e simultânea, ou seja, tornam o método ainda mais eficiente e rápido (HIEMSTRA; KOK, 2007; CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

Portanto, o desenvolvimento de método analítico e a determinação de bisfenol A em leite podem contribuir para as ações de vigilância sanitária ao proporcionar subsídios que permitam avaliar o nível de exposição à substância. Por conseguinte, este estudo teve como objetivo desenvolver e validar método analítico para determinação de bisfenol A usando QuEChERS e CLUE-EM/EM e avaliar a presença da substância em leite fluido integral e leite em pó integral comercializados no município do Rio de Janeiro.

## 1.1 Obesidade

Nas últimas décadas houve um aumento no número de obesos no mundo. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) estimam que, em 2016, mais de 1,9 bilhão de adultos estavam com excesso de peso, destes, 650 milhões eram obesos. Mais de 41 milhões de crianças abaixo de 5 anos estavam com sobrepeso ou obesidade. A Organização ainda estima que mais de 340 milhões de crianças e adolescentes, com idade entre 5 e 19 anos, estavam acima do peso ou obesos no mesmo período (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2018).

O excesso de peso é um fator de risco para doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), incluindo diabetes, doenças cardiovasculares, principalmente, acidente vascular cerebral e doença cardíaca, e câncer. A obesidade infantil está associada com maior chance de

obesidade, morte prematura e incapacidade na vida adulta, portanto a obesidade é um dos maiores problemas de saúde pública do mundo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2015a; NGUYEN, EL-SERAG, 2010). Em relação ao Brasil, dados da pesquisa de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL) de 2018, do Ministério da Saúde (MS), mostram que 55,7% dos brasileiros acima dos 18 anos de idade estão acima do peso, destes, 19,8% são obesos. A pesquisa ainda aponta que 74% dos óbitos no país foram relacionados com as DCNT (BRASIL, 2019).

Estudo da carga global da obesidade mostrou que em 2030 mais de 3,3 bilhões de pessoas no mundo terão excesso de peso. Embora, atualmente, o excesso de peso seja mais comum em países desenvolvidos, tem se observado um aumento na prevalência da obesidade e sobrepeso em países em desenvolvimento. Em 2013, a OMS estimou um crescimento de 30% na prevalência de sobrepeso e obesidade infantil em países em desenvolvimento quando comparado com os desenvolvidos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2015a; KELLY *et al.*, 2008). A melhor forma de prevenir o excesso de peso na idade adulta é a intervenção em fases precoces da vida (MATOS *et al.*, 2011).

Obesidade pode ser entendida como um acúmulo excessivo de gordura no organismo levando a um comprometimento da saúde (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2015a). Esse acúmulo é resultante do desequilíbrio energético, que pode ser ocasionado pelo excesso de consumo de calorias e/ou inatividade física. Fatores genéticos também desempenham papel importante na determinação da suscetibilidade do indivíduo para o ganho de peso, porém o estilo de vida e os fatores ambientais são os que mais contribuem para o surgimento do sobrepeso e da obesidade (NICHOLLS, 2013; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2015b).

Apesar de se creditar aos alimentos densoenergéticos e ao sedentarismo a raiz de tal aumento, pode haver outras causas envolvidas com o excesso de peso. O crescimento do sobrepeso e da obesidade pode estar relacionado a um aumento significativo no uso de produtos químicos industriais ao longo dos anos. Ou seja, substâncias exógenas que induzem a obesidade, "obesogênicos ambientais", são agora considerados como uma das possíveis causas da obesidade. Especialmente, os produtos químicos xenobióticos ambientais existentes, como os disruptores endócrinos, em especial, o bisfenol A (GRÜN; BLUMBERG, 2006; WADA *et al.*, 2007).

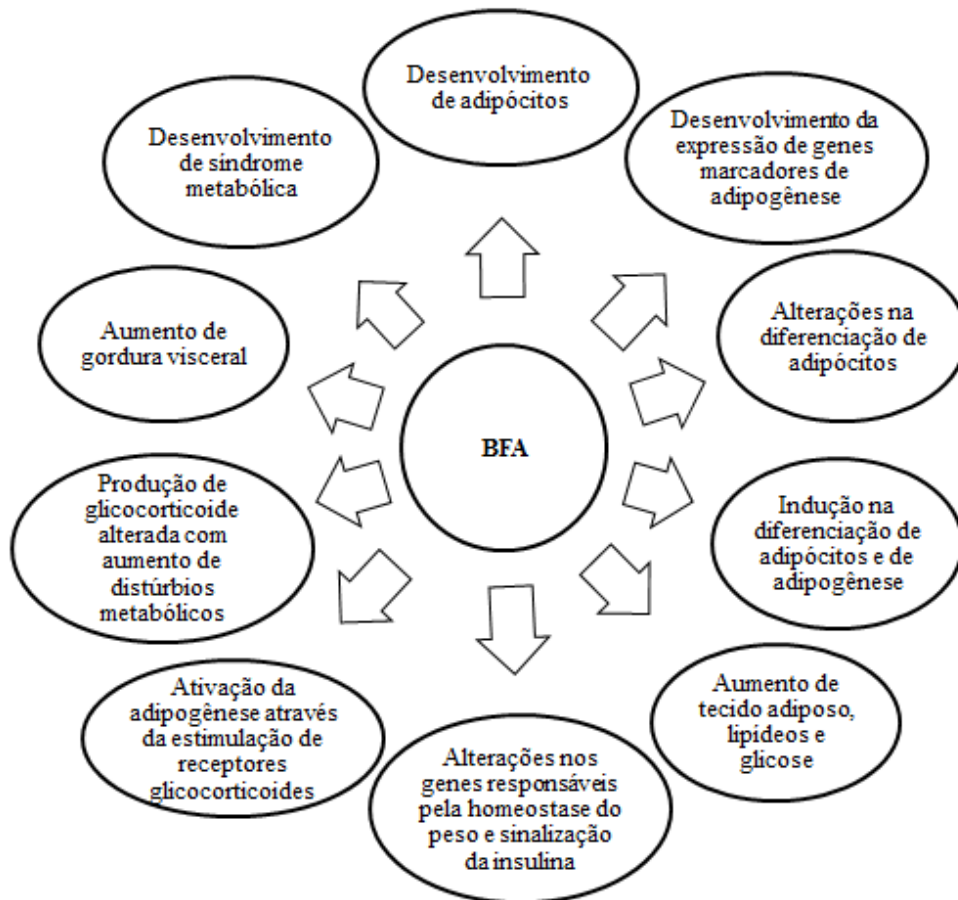
Os obesogênicos ambientais são definidos como químicos que inadequadamente alteram as funções metabólicas como a homeostase de lipídios, o armazenamento de gordura, o balanço energético, a regulação de apetite e da saciedade o que pode contribuir para o

desenvolvimento da obesidade. Dessa forma, se uma substância química tem a possibilidade de provocar mudanças epigenéticas permanentes em um organismo e se a exposição ocorre durante uma janela crítica de desenvolvimento, quando as células germinativas estão sendo programadas, isso pode determinar se os efeitos de um obesogênico serão transitórios ou permanentes. Portanto, o disruptor pode ter um efeito direto sobre um tecido alvo particular através de um mecanismo de ação conhecido e também pode causar efeitos disseminados, às vezes sutis, em diferentes sistemas de órgãos que promovem a obesidade no indivíduo exposto (GRÜN; BLUMBERG, 2007; JANESICK; BLUMBERG, 2016).

Em relação ao bisfenol A, estudos recentes com animais têm sugerido que a exposição a essa substância pode estar relacionada à resistência a insulina, ganho de peso e, conseqüentemente, desenvolvimento da obesidade (RUBIN *et al.*, 2001; ALONSO-MAGDALENA *et al.*, 2006; SOMM *et al.*, 2009). Alguns potenciais mecanismos de ação do bisfenol A envolvidos com a obesidade são apresentados na Figura 1.

Portanto, é admissível a hipótese de que a exposição ambiental ao bisfenol A possa ter um papel no desenvolvimento da obesidade em humanos.

Figura 1 - Esquema dos potenciais mecanismos de ação do bisfenol A (BFA) no desenvolvimento da obesidade



Fonte: LEGEA Y; FAURE, 2017; PONTELLI; NUNES; OLIVEIRA, 2016; VOM SAAL *et al.*, 2012.

## 1.2 Disruptores / Interferentes / Desreguladores endócrinos

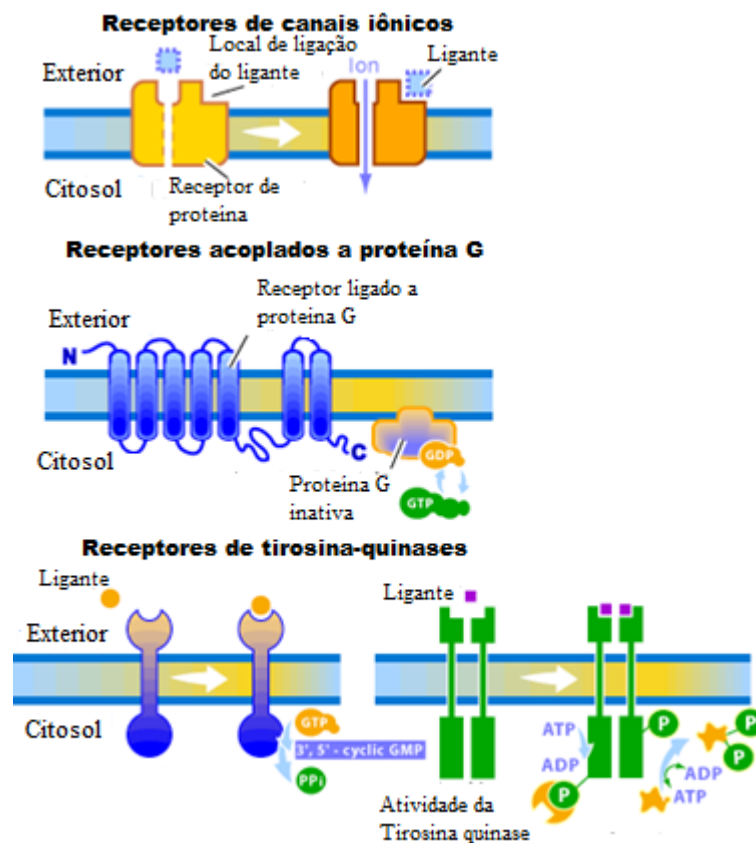
Para compreender a desregulação endócrina é importante entender as características básicas do sistema endócrino. Esse sistema consiste em uma rede integrada de múltiplos órgãos, de variadas origens embrionárias, que liberam hormônios capazes de exercerem seus efeitos em células-alvo próximas ou distantes (MOLINA, 2014).

Os hormônios endócrinos quase sempre se combinam a receptores hormonais, que estão presentes nas superfícies das células ou no seu interior. Depois da aproximação e interação (hormônio-receptor) ocorre uma série de reações bioquímicas, levando a respostas biológicas específicas. Eles circulam em níveis muito baixos de modo que o receptor deve ter afinidade e especificidade elevadas pelos hormônios para produzir uma resposta (GUYTON; HALL, 1997).



Os efeitos biológicos dos hormônios são exercidos por sua ligação a receptores hormonais específicos nas células-alvo, e o tipo de receptor ao qual se ligam é determinado, em sua grande parte, pela estrutura do hormônio. A partir da sua localização celular, os receptores hormonais podem ser classificados em receptores de membrana celular ou receptores intracelulares. Os primeiros localizam-se dentro da dupla camada fosfolipídica da membrana celular das células-alvo como apresentado na Figura 2. A ligação do hormônio aos receptores de membrana celular e a formação do complexo hormônio-receptor desencadeia uma cascata de sinalização de eventos intracelulares, resultando em uma resposta biológica específica (HEINDEL, 2003; BARRA *et al.*, 2004; HUGO *et al.*, 2008; WANDERLEY, FERREIRA, 2010).

Figura 2 - Desenho esquemático dos receptores de membrana celular

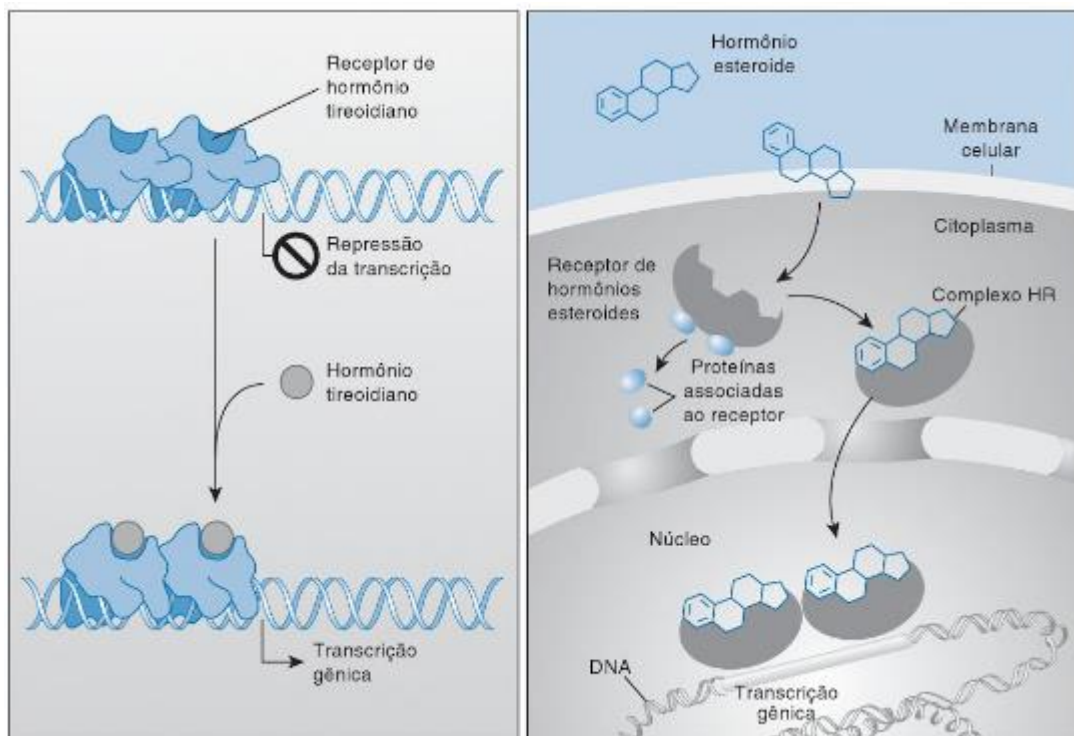


Fonte: Adaptado de MOURA, 2012.

Os receptores de membrana celular são classificados em canais iônicos regulados por ligantes e em receptores que regulam a atividade das proteínas intracelulares (receptores acoplados à proteína G e os receptores de tirosina-quinases) (MOLINA, 2014).

Os receptores intracelulares consistem em fatores de transcrição que possuem locais de ligação para o hormônio e o ácido desoxirribonucleico (DNA), e que funcionam como fatores de transcrição regulados por ligantes (hormônios). A formação do complexo hormônio-receptor e a ligação ao DNA resulta em transcrição gênica reprimida ou ativada. Podem ser identificados dois tipos de receptores intracelulares: receptor de hormônio tireoidiano e receptor de esteroides. O receptor de hormônio tireoidiano não ocupado se liga ao DNA e reprime a transcrição, entretanto, a ligação do hormônio tireoidiano ao receptor possibilita a ocorrência de transcrição gênica como demonstrado na Figura 3. Já o receptor de esteroide não se liga ao DNA na ausência do hormônio. Porém, após a ligação do hormônio esteroide a seu receptor, o receptor se dissocia das proteínas chaperonas associadas a ele, o complexo hormônio-receptor é transportado para o núcleo, onde se liga a seu elemento de resposta específico no DNA, dando início à transcrição gênica como apresentado na Figura 3 (GUYTON; HALL, 1997; MOLINA, 2014).

Figura 3 - Esquema de ação dos receptores intracelulares



Fonte: MOLINA, 2014.

Dessa forma, os receptores nucleares compreendem uma superfamília de receptores proteicos intracelulares relacionados estruturalmente e em sequência, sendo incluídos na classe dos fatores transcripcionais. Esta superfamília de proteínas inclui receptores para glicocorticoides, andrógenos, mineralocorticoides, progesterona, estrogênio, hormônios

tireoidianos, vitamina D, ácido retinoico, ácido 9-*cis*-retinoico, além de outros ligantes. Foram identificados mais de 40 receptores nucleares em humanos. Todos os membros desta superfamília possuem a mesma organização modular, com um domínio N-terminal, um domínio central de interação com o DNA, um domínio curto de conexão e um domínio C-terminal, que é o responsável pelo reconhecimento e interação com o ligante (KUIPER *et al.*, 1997).

Os estrogênios são hormônios sexuais sintetizados a partir do colesterol responsáveis pelo desenvolvimento de características sexuais femininas, essenciais na diferenciação sexual, pré e pós-nascimento. Atuam ainda em diferentes sistemas como o imunológico e cardiovascular, além de influenciarem no comportamento e no metabolismo. Eles também atuam nos órgãos reprodutores masculinos, tais como testículos e próstata, porém nos machos estes desempenham um papel secundário em relação aos androgênios (JAMESON, 2014).

O mecanismo de ação do estrógeno envolve a ligação a receptores nucleares específicos, denominados receptores de estrógeno (RE). Uma vez ligado ao estrógeno, o RE sofre uma alteração conformacional, permitindo que o receptor se ligue com elevada afinidade a cromatina e module a transcrição de genes alvos. Existem dois tipos de RE: o RE $\alpha$  e RE $\beta$ ; ambos são membros da superfamília de receptores proteicos intracelulares. O RE $\alpha$  está presente em poucos tecidos e, frequentemente, envolvido em eventos reprodutivos. Já o RE $\beta$  participa de importante papel na fisiologia de muitos tecidos (KUIPER *et al.*, 1997).

Segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos - *United States Environmental Protection Agency (U.S.EPA)* - algumas substâncias químicas apresentam a capacidade de perturbar o mecanismo regulador de hormônios naturais no corpo humano, pois são capazes de alterar a síntese, a secreção, o transporte, a ligação, a ação ou eliminação de hormônio natural no corpo, sendo conhecidas como disruptores (desreguladores ou interferentes) endócrinos. Dessa forma, esses disruptores apresentam a capacidade de alterarem uma ou várias funções do sistema endócrino gerando efeitos adversos num organismo ou na sua descendência (U.S.EPA, 1997; BILA; DEZOTTI, 2007).

Existem evidências que numerosas substâncias sintéticas e naturais apresentam potencial de desregulação endócrina. Em relação às substâncias naturais, as mais estudadas são a genisteína e metaresinol e os estrogênios naturais 17 $\beta$ -estradiol, estrona e estriol. Já para às sintéticas têm chamado atenção às utilizadas na agricultura e seus subprodutos, como pesticidas, herbicidas, fungicidas e moluscicidas; às utilizadas nas indústrias e seus subprodutos, como dioxinas, bifenilas policloradas (PCB), alquilfenóis e seus subprodutos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP), ftalatos e bisfenol A; e as substâncias de uso

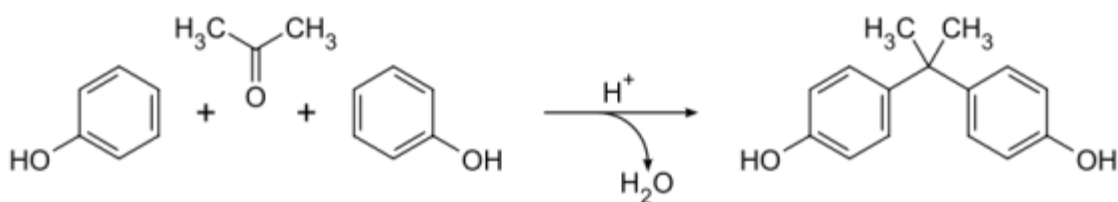
farmacêutico, como os estrogênios sintéticos dietilestibestrol e  $17\alpha$ -etinilestradiol. (U.S.EPA, 1997; WUTTKE; JARRY; SEIDLOVA-WUTTKE, 2010).

Vários são os efeitos associados à exposição de disruptores endócrinos em animais tais como desenvolvimento sexual anormal em répteis e mamíferos; respostas feminizadas em peixes e aves; pseudo-hermafroditismo em gastrópodes marinhos; falhas reprodutivas em mamíferos; redução da fecundidade em peixes e deformações embriônicas em aves (BILA; DEZOTTI, 2007; GHISELLI, JARDIM, 2007). Recentemente o aumento da prevalência de distúrbios como obesidade, déficit neurocomportamental, diabetes, hipotireoidismo, endometriose, autismo, cânceres de mama, próstata, testículo, tireoide e endométrio, e puberdade precoce estão sendo associados à exposição aos disruptores endócrinos (PONTELLI; NUNES; OLIVEIRA, 2016; WANG *et al.*, 2012).

### 1.3 Química do bisfenol A

Bisfenóis fazem parte de uma classe de substâncias difenilalcanos, sendo o 2,2-bis(4-hidroxifenil)propano; 2,2-bis(4,4'-dihidroxifenil)propano ou ainda 4,4'-isopropileno-difenol, CAS n° 80-05-7, conhecido popularmente como Bisfenol A o representante de maior expressão atualmente. É uma substância química orgânica obtida a partir da reação de condensação da acetona com dois equivalentes de fenol em meio ácido como apresentado na Figura 4.

Figura 4 - Esquema da reação de formação de bisfenol A



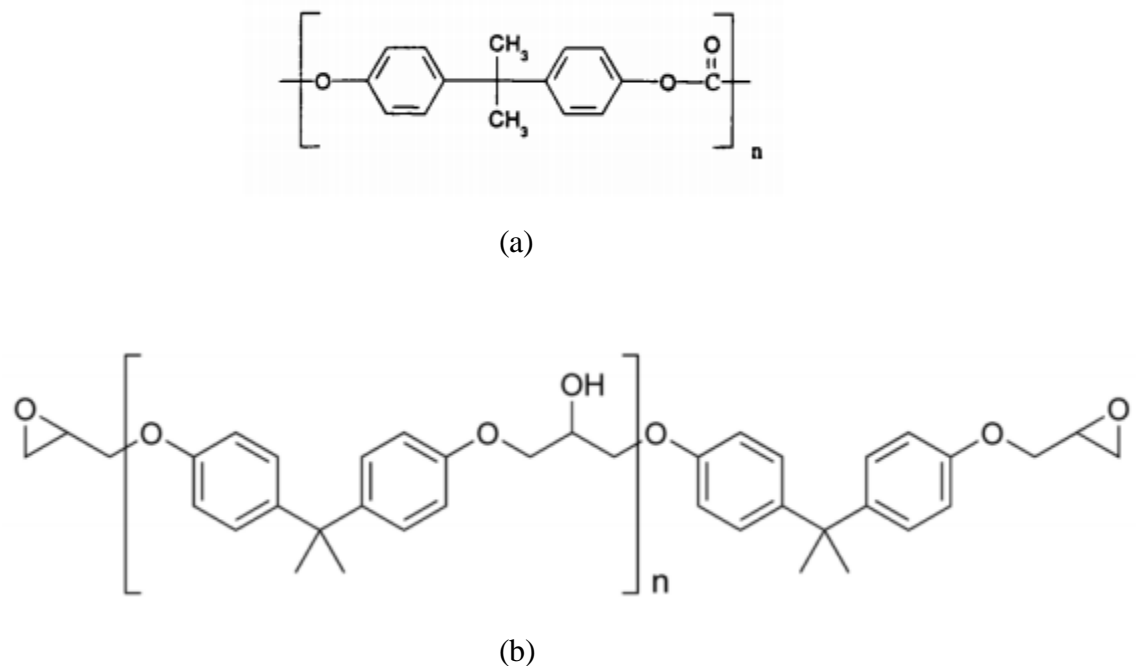
Fonte: ALONSO, 2013.

O bisfenol A possui fórmula molecular  $C_{15}H_{16}O_2$  ou  $(CH_3)_2C(C_6H_4OH)_2$ ; massa molecular 228,291g/mol (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2017); pKa em 9,59-11,30 (COUSINS *et al.*, 2002); pressão de vapor  $5,3 \times 10^{-6}$  Pa (COUSINS *et al.*, 2002); constante Lei de Henry  $4,03 \times 10^{-6}$  Pa.m<sup>3</sup>/mol<sup>l</sup> (COUSINS *et al.*, 2002); ponto de fusão 150 a 157°C; ponto de ebulição 220°C a 760 mmHg e solubilidade

em água 120-300 mg/L a 25°C (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2017). Apresenta um coeficiente de partição octanol/água (Log  $K_{ow}$ ) de 3,40 (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2017), ou seja, é uma substância moderadamente hidrofóbica. Como o  $K_{ow}$  é relativamente alto, a substância apresenta elevada afinidade por fases orgânicas e lipofílicas, bem como um importante potencial de adsorção sobre as matérias particuladas em suspensão no ar e na água, assim apresenta um potencial de bioacumulação nos organismos (COUSINS *et al.*, 2002; GHISELLI; JARDIM, 2007; STAPLES *et al.*, 1998).

Ele constitui a unidade básica de polímeros e revestimentos de alto desempenho, principalmente plásticos, policarbonatos e resina epóxi. O policarbonato é um polímero de cadeia longa formada por monômeros de bisfenol A, enquanto as resinas são produtos da reação entre epiclórídria e bisfenol A como apresentados na Figura 5.

Figura 5 - Estrutura química do policarbonato de bisfenol A (a) e da resina epóxi (b)



Fonte: KRISHNAN *et al.*, 1993; ALONSO, 2013.

O aumento na produção global de bisfenol A ao longo dos anos demonstra que ele é um dos produtos químicos de maior prevalência comercializados na atualidade. Em 1993 a produção global foi estimada em 1.100 toneladas, já em 1996 o valor atingiu 1,6 milhão de toneladas (GROSHART; OKKERM; PIJNENBURG, 2001). Em 2006 a demanda global atingiu 3,9 milhões de toneladas e em 2010 houve um acréscimo para cerca de 5 milhões de toneladas (BALLESTEROS-GÓMES; RUBIO; PÉREZ-BENDITO, 2009).

Esse aumento na produção está relacionado com a ampla aplicação que o bisfenol A possui. A categoria predominante de aplicação é através da modificação estrutural ou polimerização, e a outra é a partir da utilização como aditivo. Dentre os polímeros que utilizam o bisfenol A o policarbonato e as resinas epóxi são os principais, mas existem outros menos comuns, como polissulfona, poliésteres insaturados, resinas bisfenol A formaldeído, poliacrilatos, polieterimida, tetrabromobisfenol A e benzoxazinas. Já o uso como aditivo se faz principalmente no papel térmico e no poli(cloreto de vinila) (PVC) (GEENS; GOEYENS; COVACI, 2011). Como os polímeros possuem qualidades comerciais desejáveis, como transparência e resistências térmica e mecânica, são, por isso, encontrados em embalagens plásticas, utensílios domésticos, embalagens retornáveis de água, cerveja e refrigerantes e frascos para alimentos infantis; já as resinas apresentam ótima resistência química e boas propriedades térmicas, sendo encontradas nos revestimentos de embalagens metálicas de alimentos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009; HUGO *et al.*, 2008).

O revestimento é feito para evitar uma maior interação entre o alimento e o metal da lata durante o processo, transporte e armazenamento, protegendo o alimento de contaminação, evitando a corrosão do recipiente e de possíveis alterações organolépticas nos alimentos (ACKERMAN *et al.*, 2010). O bisfenol A ainda pode ser encontrado em materiais médicos e dentários, assim como o policarbonato de bisfenol A e as resinas epóxi-fenólicas são encontrados na superfície de revestimento de tanques residenciais de armazenamento de água potável. Em menores proporções na indústria de pneus, em placas de circuitos impressos, em adesivos e retardante de chamas (BAE; JEONG; LEE, 2002; DEBA; NÚÑEZ, 2017).

A obtenção de policarbonatos e resinas é possível através da reação de polimerização. A polimerização, como todas as reações não tem 100 % de rendimento e, pode resultar em monômeros residuais da substância no produto acabado, logo pequenas quantidades de bisfenol A podem migrar para o alimento acondicionado em latas ou em embalagens plásticas. Além disso, essa molécula não está ligada ao polímero quimicamente e pode migrar da embalagem para os alimentos apenas com mudanças de temperatura, pH ou dano à embalagem (GEENS *et al.*, 2012).

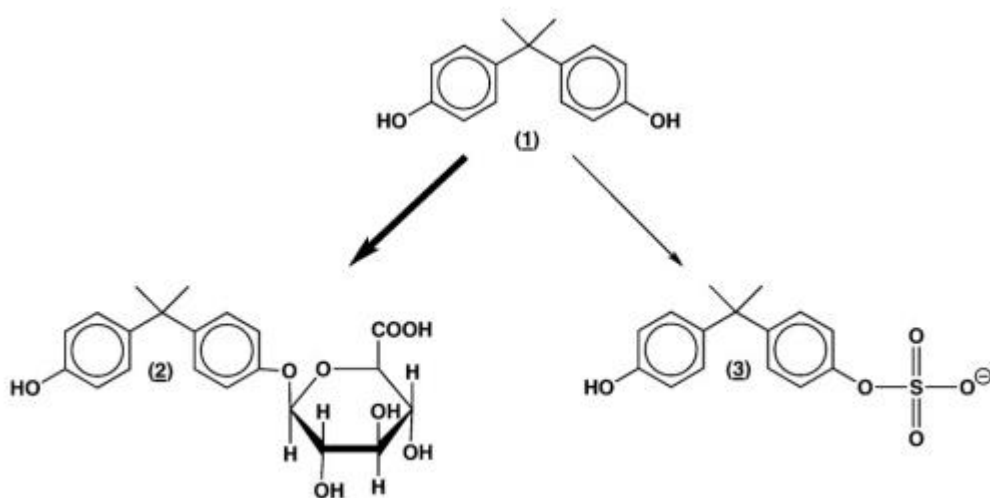
#### **1.4 Aspectos toxicológicos do bisfenol A**

O bisfenol A tem diferentes formas de atingir o organismo, visto que pode ser absorvido pela via oral, inalatória e cutânea. Devido sua presença no meio ambiente, os indivíduos se encontram expostos ao bisfenol A de maneira crônica, porém estudos têm

demonstrado que os alimentos, principalmente, os alimentos enlatados são a maior fonte de exposição. Dessa forma, acredita-se que os alimentos constituem mais de 90% da exposição total ao bisfenol A, enquanto a ingestão, através de cirurgia dentária, por exemplo, responde por 5% da absorção total da substância (ACCONCIA; PALLOTTINI; MARINO, 2015; JUAN-GARCIA; GALLEGU; FONT, 2015).

Após a administração oral, o bisfenol A é rapidamente absorvido através do trato gastrointestinal, sofrendo um metabolismo de primeira passagem no intestino e fígado. Ele não é extensivamente metabolizado através das reações de fase I, mas rapidamente conjugado com ácido glicurônico (metabolismo de fase II) para formar o bisfenol A-glicurônico não ativo na parede do intestino e fígado. Pequenas quantidades de bisfenol A também podem reagir com sulfato para formar bisfenol A-sulfato. A formação de conjugados, seja com sulfato ou ácido glicurônico, é considerada um processo de destoxificação e apenas as formas livres de bisfenol A apresentam atividade estrogênica. Em todas as espécies estudadas a rota metabólica principal de destoxificação é a via de glicuronidação (conjugação de bisfenol A com ácido glicurônico). Os conjugados formados caem na corrente sanguínea a fim de atingirem o rim, sendo então excretados na urina em até 6 horas (VANDENBERG *et al.*, 2010; GEENS *et al.*, 2012). A Figura 6 representa as principais vias de biotransformação do bisfenol A.

Figura 6 - Esquema de biotransformação do bisfenol A (1) em bisfenol A-glicurônico (2) e bisfenol A-sulfato (3), em roedores e humanos



Fonte: DEKANT; VÖLKEL, 2008.

Devido à eficiência da biotransformação e da excreção, o bisfenol A apresenta modesta capacidade de bioacumulação. Porém, ele tem sido detectado em amostras de urina

coletadas em diferentes países como nos Estados Unidos, na China e nos países da Europa (COVACI *et al.*, 2015; GAO *et al.*, 2016; LANG *et al.*, 2008). Análises de plasma, fluido folicular, sêmen, líquido amniótico, saliva, leite materno e tecido adiposo também têm apresentado essa substância (VANDENBERG *et al.*, 2010).

Por este motivo a toxicidade do bisfenol A tem sido investigada nos últimos anos. A intensidade da ação do agente tóxico, de modo geral, é proporcional à concentração e ao tempo de exposição. Portanto, produtos químicos tóxicos em baixas doses apresentam geralmente uma toxicidade relativamente baixa. Entretanto, estudos com alguns disruptores endócrinos têm mostrado que mesmo diante da exposição de baixas doses do agente tóxico a dose-resposta será diferente da tradicional, podendo gerar danos à saúde humana (VANDENBERG *et al.*, 2012).

O bisfenol A tem sido usado como um dos modelos mais frequentes para demonstrar a baixa dose e a natureza não monotônica dos hormônios e dos disruptores endócrinos que regulam ou afetam o sistema endócrino. Curvas dose-resposta não monotônicas indicam uma mudança na direção, produzindo um declive da curva dose-resposta. As curvas dose-resposta não monotônicas muitas vezes seguem uma forma "U invertido". Hormônios endógenos frequentemente acompanham esses efeitos não lineares em baixas doses no corpo, devido a mecanismos endócrinos, como a cinética de ligação e ações específicas do tecido. A chamada "hipótese de baixa dose" apoia a ideia de que "baixas doses", ou seja, aquelas na faixa de exposição humana ambiental podem agir dessa maneira não linear. O bisfenol A tem efeitos em baixas doses que podem não ser aparentes em doses mais altas usadas em estudos tradicionais de toxicologia (VANDENBERG *et al.*, 2012; ROCHESTER, 2013).

Estudos *in vivo* vêm demonstrando alguns efeitos que às baixas doses de bisfenol A podem ocasionar. Vom Saal *et al.* (1998) mostraram que ratos expostos a administração oral com níveis muito baixos de bisfenol A na faixa de 0,0020 - 0,020 mg/kg de peso corpóreo (PC) durante a gravidez tiveram uma diminuição na produção de espermatozoide na prole. Howdeshell *et al.* (1999) observaram que ratas tratadas com 0,040 - 0,40 mg/kg de PC durante a gravidez e lactação também produziram alterações significativas no comportamento da prole como a puberdade precoce em machos e fêmeas. Estudo de Rubin *et al.* (2001) demonstrou aumento de peso corporal na prole nascida de ratas-mães expostas ao bisfenol A, embora o aumento tenha persistido por mais tempo nas fêmeas. Além disso, na descendência feminina, a dose mais baixa de bisfenol A produziu um efeito maior e mais persistente no peso corporal em relação à dose mais elevada. Miyawaki *et al.* (2007) também demonstraram



que houve aumento do peso corporal da prole de ratas tratadas com bisfenol A durante a gravidez e lactação.

Nos estudos *in vitro* têm sido observados efeitos adversos em algumas linhagens celulares. Eles têm revelado uma variedade de vias moleculares através da qual a substância pode gerar diferentes respostas celulares, portanto ela pode agir: a) perturbando o sistema endócrino através da sua capacidade para mimetizar, aumentar ou inibir a atividade de estrogênios endógenos; b) interrompendo a ação de receptores endócrinos nucleares; c) agindo sobre o sistema de androgênio; d) destruindo a função do hormônio da tireoide; e) influenciando o desenvolvimento, diferenciação e função do sistema nervoso central; f) atuando sobre o sistema imune; g) impactando os mecanismos de transdução dos sinais intracelulares (modificação na expressão e atividade da enzima do citocromo P450 e alteração na expressão da proteína que se liga ao hormônio); h) nos mecanismos epigenéticos através da metilação mediada pelo promotor metilado (WETHERILL *et al.*, 2007; ROCHESTER, 2013; JUAN-GARCIA; GALLEG0; FONT, 2015).

Apesar de a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (*European Food Safety Authority* - EFSA) considerar que baixas doses (bisfenol A < 50 µg/kg PC/dia) não causem malefícios para o organismo humano, estudos em animais e em cultura de células vêm demonstrando que mesmo em baixas concentrações o bisfenol A pode causar alterações no DNA e em diferentes vias metabólicas (WITORSCH, 2002; FLINT *et al.*, 2012; CAO, 2010). Outros estudos têm mostrado alguns efeitos que o bisfenol A tem gerado em humanos como apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Exposição ao bisfenol A e efeitos em humanos (continua)

<b>Efeito</b>	<b>Concentração de Bisfenol A</b>	<b>Autor</b>
Diminuição da probabilidade de fertilização com aumento do bisfenol A sérico em mulheres e homens.	0,3 – 2,5 <sup>1</sup>	FUJIMOTO <i>et al.</i> , 2011
Trabalhadores expostos ao bisfenol A tinham densidade de espermatozoides significativamente menor.	101,94 <sup>1</sup>	XIAO <i>et al.</i> , 2009
Bisfenol A sérico maior foi significativamente associado com menor peso ao nascer e menor tamanho para a idade gestacional.	0,5 – 2,5 <sup>1</sup>	CHOU <i>et al.</i> , 2011
Aumento do bisfenol A urinário materno foi associado a comportamento ansioso e depressão na prole.	2,0 – 4,1 <sup>2</sup>	BRAUN <i>et al.</i> , 2011

Tabela 2 - Exposição ao bisfenol A e efeitos em humanos (conclusão)

Efeito	Concentração de Bisfenol A	Autor
Bisfenol A urinário elevado foi significativamente associado ao aumento do diabetes tipo 2.	3,9 – 4,0 <sup>2</sup>	SHANKAR; TEPPALA, 2011
Bisfenol A urinário elevado foi significativamente associado com maior IMC <sup>3</sup> e circunferência da cintura.	2,1 <sup>2</sup>	CARWILE; MICHELS, 2011

Fonte: O autor, 2019.

Legenda: <sup>1</sup>µg/L bisfenol A sérico; <sup>2</sup>µg/L bisfenol A urinário; <sup>3</sup>IMC (Índice de Massa Corporal).

O estrogênio desempenha importante função no metabolismo do tecido adiposo, pois possui a capacidade de regular o peso corporal e a adiposidade por ação sobre o controle de acúmulo de triglicérides. Dessa forma, avaliar se o bisfenol A, que mimetiza a atividade estrogênica, teria a capacidade de atuar da mesma forma *in vitro* tem sido um campo fértil de pesquisa. Visto que os estudos vêm demonstrando o aumento do peso corporal dos animais expostos ou da prole proveniente de ratas expostas à substância (RUBIN *et al.*, 2001; MIYAWAKI *et al.*, 2007).

Masuno *et al.* (2002; 2005) demonstraram que o bisfenol A tem a capacidade de ativar a diferenciação de fibroblastos 3T3-L1 em adipócitos e também apresenta a capacidade de acelerar a diferenciação de adipócitos terminais. Os autores ainda observaram que o tratamento de bisfenol A combinado com insulina aumentou o acúmulo de triglicérido nas células em aproximadamente 85%. Dessa forma, a exposição contínua de ratos ao bisfenol A durante períodos perinatal e pós-natal causou o desenvolvimento de obesidade e hiperlipidemia (MASUNO *et al.*, 2005).

Devido às evidências crescentes de que o bisfenol A pode afetar negativamente os seres humanos, mesmo em doses bem abaixo daquelas que envolvem efeitos adversos em testes de avaliação da toxicidade, entender as principais vias de exposição da substância é de suma importância (DEKANT; VÖLKEL, 2008).

## 1.5 Exposição

A presença da substância no meio ambiente torna a população exposta de forma crônica, porém estudos mostram que a alimentação é o principal meio de exposição (BEMRAH *et al.*, 2014; CAO *et al.*, 2011). A fim de se estimar a exposição através da dieta, têm sido utilizados diferentes métodos e alguns estudos medem as concentrações de bisfenol

A nos alimentos, para observar a migração produzida no envase do alimento e estimar a exposição do bisfenol A no organismo. Outros estudos se fixam nas análises dos tecidos e fluidos corporais dos indivíduos expostos, portanto, podem avaliar o colostro, o fluido folicular e amniótico, o cordão umbilical, o tecido placentário e o fígado de fetos (JUAN-GARCIA; GALLEGO; FONT, 2015).

O bisfenol A é extensamente usado na produção de adesivos, papéis para fax, tubulações, painéis de carros, produtos eletrônicos, plásticos policarbonatos duros, resinas epóxi dentre outros produtos. É importante salientar que os plásticos policarbonatos e resinas epóxi se encontram em contato direto com alimentos, portanto a substância tem a possibilidade de migrar para o produto. Nos alimentos enlatados, alimentos infantis, produtos cárneos, pescados, condimentos, *snacks*, frutas e leite têm sido identificados níveis relevantes de bisfenol A durante o aquecimento e estocagem comprovando a migração da substância (KRISHNAN *et al.*, 1993; JUAN-GARCIA; GALLEGO; FONT, 2015).

Estudo de Cao *et al.* (2011) encontrou 55 amostras contaminadas por bisfenol A dos 154 alimentos analisados, sendo os alimentos enlatados aqueles que apresentaram maior concentração de bisfenol A variando de 10,5 ng/g a 106 ng/g em carnes e peixes enlatados, respectivamente. Os autores encontraram uma contaminação de bisfenol A em torno de 15,3 ng/g em leite em pó enlatado.

Estudo da Autoridade Europeia sobre a exposição de bisfenol A, a partir de fontes alimentares e não alimentares, nas diferentes faixas etárias da população, mostra que as fontes dietéticas são as que mais contribuem para a exposição da população a substância mesmo em fases tão precoces de vida (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2015).

## **1.6 Migração**

Através de fenômenos físico-químicos os componentes do material das embalagens podem ser transferidos para os alimentos. Esse fenômeno de transferência é conhecido como migração que pode ser classificada em global e específica, onde a primeira se refere à quantidade de componentes transferida dos materiais em contato com alimentos ou com seus simulantes, mantendo-se as condições usuais de elaboração, emprego e armazenamento ou nas condições equivalentes de ensaio. Já a específica é a quantidade de um componente de interesse toxicológico, não polimérico, transferido dos materiais em contato com alimentos para os alimentos ou seus simulantes, nas condições equivalentes de ensaio (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2001).

A transferência de substâncias da embalagem para alimentos depende de alguns fatores como do coeficiente de difusão da substância no polímero e da relação entre a concentração da substância na embalagem e no alimento, quando em equilíbrio, determinada pelo coeficiente de partição de Nerst. A difusão acontece de acordo com a concentração das moléculas nos meios vizinhos, ocorrendo a migração de áreas de elevada concentração para baixa concentração (VOM BRUCK *et al.*, 1979 *apud* BAZILIO, 2014).

Essa transferência pode ser simulada através do teste de migração que irá reproduzir as condições de contato da embalagem com o alimento, em função do tipo de alimento, tempo de contato e da temperatura. São usados solventes simulantes, ou simulantes alimentares, que tentam reproduzir o pH, o teor de gordura dos alimentos e sua eventual graduação alcoólica. A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 51, de 26 de novembro de 2010, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), dispõe sobre os simulantes para diferentes classes de alimentos, além dos tempos e temperaturas dos ensaios de migração total e específica em materiais, embalagens e equipamentos plásticos destinados a entrar em contato com alimentos. Ela estabelece as condições para o desenvolvimento do ensaio de migração em solvente simulante, sendo este escolhido com base nas características físico-químicas do alimento (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010).

Há uma quantidade máxima admissível que um componente específico do material de embalagem em contato com alimento possa ser transferido aos simulantes, nas condições de ensaio. Essa quantidade é definida como limite de migração específica (LME) que deve assegurar que o material em contato com o alimento não represente um risco para a saúde (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2012). O LME é estabelecido através da convenção de que uma pessoa com peso corporal de 60 kg consome diariamente 1 kg de alimentos, embalados em um recipiente de forma cúbica com 6 dm<sup>2</sup> de área superficial de liberação da substância (COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS, 2011a)

A ANVISA estabelece através da RDC nº56, de 16 de novembro de 2012, o LME para o bisfenol A em 0,6 mg/kg (600 µg/kg) do alimento (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2012). Em regulamento da União Europeia publicado em fevereiro de 2018 ficou estabelecido que a migração para o interior ou para a superfície dos alimentos a partir de vernizes ou revestimentos aplicados aos materiais e objetos não deveriam exceder um LME de 0,05 mg (50 µg) de bisfenol A por quilograma de alimento (COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS, 2018).

Estudos que avaliaram o efeito da migração de bisfenol A a partir de policarbonato em mamadeiras encontraram valores oscilando 0,3 µg/L a 137 µg/L. Quando avaliado a migração

da substância a partir de enlatados, bebidas e comidas, os valores encontrados oscilaram entre 0,01 µg/L a 842 µg/L (GEENS *et al.*, 2012). O tipo de alimento também interfere na concentração de bisfenol A mesmo que seja utilizada a mesma embalagem, uma vez que a solubilidade de bisfenol A é maior em produtos como pescados e mariscos quando comparado com alimento para lactentes (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2015).

Relatório da reunião dos peritos da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) mostra que a migração de bisfenol A para os alimentos e a exposição por via alimentar, aumenta progressivamente com a reutilização contínua do recipiente plástico de policarbonato. O aumento na migração da substância também é possível de ser mensurado através de processos de aquecimento direto da embalagem plástica de policarbonato ou na embalagem metálica revestida com resina epóxi (KRISHNAN *et al.*, 1993; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2011).

A partir do risco estabelecido pelos estudos e das proibições dos governos ao redor do mundo, a ANVISA determinou através da Resolução RDC nº 41/2011, a proibição de se comercializar mamadeiras em policarbonatos de bisfenol A destinadas à alimentação de lactentes. Essa medida foi importante para limitar a ingestão da substância em crianças que fazem uso de mamadeiras (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2011). Entretanto, crianças que fazem uso de fórmulas infantis estão expostas a contaminação por bisfenol A, uma vez que a resina epóxi é utilizada no revestimento dessas latas. Então, mesmo que as mamadeiras estejam isentas, pela legislação, da presença da substância, o risco de contaminação permanece. Da mesma forma acontece com os adultos que ao consumirem produtos enlatados revestidos com resina epóxi e utilizarem recipientes plásticos de policarbonato de bisfenol A também ficam expostos à substância (MIGEOT *et al.*, 2013).

### **1.7 Embalagem de leite**

Segundo Fellows (2006) embalagem é o meio de se obter a distribuição segura de produtos em condições adequadas para o consumidor. Ela não apenas tem a atribuição de proteger o produto contra os fatores ambientais que causaria a deterioração do mesmo, mas funciona como meio de informação para o consumidor.

Ainda segundo Fellows (2006), os materiais de embalagem podem ser agrupados em 2 tipos principais: embalagens para transporte (protegem o conteúdo durante o transporte e a distribuição, mas não possuem função de marketing – Ex.: caixas de papelão, *pallets*, outros) e embalagens de varejo (protegem e fazem propaganda do alimento – Ex.: latas de metal,

garrafas de vidro, frascos, tubos plásticos rígidos e semirrígidos, embalagens cartonadas, sacos plásticos flexíveis, sachês, dentre outros).

Embora a inovação em produtos seja de fato relevante, muitas vezes a tecnologia de ruptura, que tem o poder de mudar o mercado, vem do segmento de embalagens. Essa tecnologia permitiu que o leite fosse distribuído em distâncias crescentes dos centros de produção, mudando de forma definitiva o mapa de produção de leite (SCHIMMELFENIG; SANTOS; BERNIERI, 2009). Esse produto pode ser comercializado em diferentes embalagens como apresentado na Figura 7.

Figura 7 - Diferentes materiais de embalagem para leite



Fonte: Compilação do autor, 2019<sup>1</sup>.

Legenda: (a) Embalagem cartonada; (b) Embalagem PET – Poli(tereftalato de etileno); (c) Embalagem Lata metálica; (d) Embalagem de Polietileno (PE) e poli(cloreto de vinilideno) (PVDC); (e) Embalagem Filme Laminado (Poliéster metalizado-polietileno); (f) Embalagem de vidro.

Os diferentes materiais de embalagem apresentam formas distintas de interação com os alimentos, portanto eles poderão agir de forma a estabilizar os alimentos evitando a degradação do sabor, acarretada pela oxidação da gordura devido a ação catalítica da luz com a presença de oxigênio e o escurecimento não enzimático (Reação de *Maillard*). Porém, se substâncias migrarem das embalagens para o alimento importantes consequências toxicológicas para o consumidor podem acontecer (AZEREDO, 2012).

<sup>1</sup> Montagem a partir de imagens coletadas no site de busca google.com.br

## 1.8 Aspectos legais

Desde o início das hipóteses de que o bisfenol A em baixas concentrações no organismo humano poderiam causar efeitos adversos à saúde muitos trabalhos questionam a faixa de exposição humana ao bisfenol A. Em 2006, a EFSA definiu a Ingestão Diária Aceitável (IDA) do bisfenol A em 50 µg bisfenol A/kg de PC/dia. Esta IDA tem por base o nível de dose sem efeitos nocivos - *No-Observed Adverse Effect Level* (NOAEL) - de 5.000 µg/kg PC/dia decorrente de um estudo multigeracional de toxicidade reprodutiva em ratos, e a aplicação de um fator de incerteza de 100, que é considerado seguro com base em toda informação sobre a toxicocinética do bisfenol A (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2006).

Em 2011, após avaliação dos dados toxicológicos publicados entre 2007 e 2010 a IDA foi mantida, pois a Autoridade Europeia relatava que não havia evidências baseadas em dados toxicológicos de humanos e animais que justificassem as alterações nos valores (COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS, 2011a, 2011c). No mesmo ano a Comissão Europeia publicou o Regulamento nº 10/2011, de 14 de janeiro de 2011, que autorizava o uso de bisfenol A, em embalagens plásticas que entravam em contato com alimentos, com limite de migração específica (LME) de 0,6 mg de bisfenol A/kg de alimento, não restringindo o uso do material plástico utilizado. Entretanto, em 28 de janeiro do mesmo ano publicou a Diretiva nº 8 proibindo o uso do material plástico policarbonato para a fabricação de mamadeiras (COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS, 2011b). Em 2013 o Parlamento Europeu proibiu a utilização de bisfenol A na fabricação de copos e garrafas de policarbonatos de bisfenol A destinados a lactentes (0 a 6 meses) e crianças pequenas (COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS, 2013).

Em 2014, a EFSA estabeleceu uma nova IDA de 4 µg/kg PC/dia. No entanto, a Autoridade determinou a IDA como temporária, na dependência do resultado esperado de um estudo de toxicologia a longo prazo do bisfenol A em roedores levado a cabo pelo Programa Nacional de Toxicologia da Agência Federal do Departamento de Saúde e Serviço Humano dos Estados Unidos da América - *National Toxicology Program/Food and Drug Administration* (U.S.NTP) - (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2015; NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM, 2019). Baseado no novo valor da IDA foi estabelecido um LME de 0,05 mg de bisfenol A/kg de alimento.

Apesar de ter havido restrições no uso de bisfenol A nos materiais e objetos de plástico destinados a entrar em contato com alimentos para lactentes e crianças pequenas, tais

medidas não haviam sido adotadas em relação ao bisfenol A usado em vernizes e revestimentos aplicados em latas para acondicionar alimentos. Entendendo que o mesmo pressuposto relativo à exposição de materiais de plástico em contato com alimentos é aplicável aos vernizes e revestimentos que tenham sido produzidos a partir de bisfenol A e que entrem em contato com alimentos destinados a lactentes e crianças pequenas o Regulamento da União Europeia (EU) n° 213/2018 estabeleceu que não fosse permitida a migração de bisfenol A a partir de vernizes ou revestimentos aplicados a materiais e objetos especificamente destinados a entrar em contato com fórmulas para lactentes ou produtos semelhantes especificamente destinados a crianças pequenas (COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS, 2018).

A confecção de mamadeiras usando policarbonatos de bisfenol A foi proibida no Canadá em 2008. Em 2010, na Dinamarca, foi banido o uso de bisfenol A em materiais que entrassem em contato com alimentos destinados a crianças até 3 anos. Na França a restrição de todos os materiais que contenham bisfenol A e entrem em contato com alimentos ocorre desde 2015 (BISPHENOL A, 2017).

A OMS estimou a exposição ao bisfenol A baseada nas informações disponíveis sobre padrões de consumo de alimentos e a ocorrência de bisfenol A em alimentos relevantes para os grupos populacionais de interesse. Para estimar a exposição foram consideradas variedades de dietas, combinando consumo diário de pior cenário (100% de consumo de alimentos enlatados) para o melhor cenário (25% do consumo de alimentos enlatados) com dados de concentração (média e máxima). A exposição média de bebês amamentados exclusivamente é estimada como sendo de 300 ng/kg PC/dia e a exposição no percentil 95 é estimada em 1300 ng/kg PC/dia. Com base nas estimativas mais relevantes, a exposição média para adultos foi de 10 a 400 ng/kg PC/dia. Para crianças e adolescentes a exposição média foi de 100 a 500 ng/kg PC/dia no percentil 95 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2011). Mesmo diante do pior cenário, a avaliação da exposição tem apresentado valores inferiores a IDA estabelecida. Porém, os questionamentos quanto a segurança envolvendo a exposição ao bisfenol A, mesmo em níveis baixos, permanecem inconclusivos.

No Brasil, a Resolução RDC n° 17, de 17 de março de 2008, estabelece o LME de 0,6 mg (60 µg) de bisfenol A/kg de alimento ou simulante. Já a RDC n° 41, de 16 de setembro de 2011, proíbe a fabricação e importação de mamadeiras que contenham a substância bisfenol A na sua composição. Em 2012, a RDC n° 56, de 16 de novembro de 2012, manteve o mesmo valor de LME para o bisfenol A e não autoriza o uso de bisfenol A em polímeros utilizados na



fabricação de mamadeiras e artigos similares destinados a alimentação de lactentes (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008; 2011a; 2012).

### 1.9 Métodos analíticos

Analisar bisfenol A não é uma tarefa fácil, visto que a contaminação pode ocorrer desde o tratamento de amostras até a sua determinação, por meio dos instrumentos de laboratório, solventes, reagentes, cartuchos de extração em fase sólida (EFS) e água Milli-Q (WATABE *et al.*, 2004). A remoção de bisfenol A dos solventes e da água tem sido demonstrada em alguns estudos através da pré-lavagem dos cartuchos com metanol e uso de membrana de extração (tipo Envi<sup>TM</sup>-18 Disk) para contaminantes orgânicos em amostras de água potável (INOUE *et al.*, 2000).

Devido ao grande número de alimentos contaminados com o bisfenol A muitos métodos analíticos têm sido desenvolvidos para análise das amostras. Algumas técnicas são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 3 - Métodos analíticos para determinação de bisfenol A em alimentos

Método Analítico	LOQ	LOD	Amostra	Referência
EFS/CG-EM <sup>1</sup>	0,28-85,3 µg/kg	0,06-0,36 µg/kg	Leite integral	CASAJUANA; LACORTE, 2004
Sol-gel IAE/CLAE-FL <sup>2</sup>	0,4 µg/L	0,1 µg/L	Refrigerante de laranja em lata	BRAUNRATH; CICHNA, 2005
HS-SPME-CG-EM <sup>3</sup>	0,30–0,60 µg/kg	0,10 µg/kg	Alimentos enlatados	RASTKARI; YUNESIAN; AHMADKHANIHA, 2011
ECF-SPME-CG-EM <sup>4</sup>	0,052 µg/L	0,01 µg/L	Água	MUDIAM <i>et al.</i> , 2011
IAE-CLAE-FL <sup>5</sup>	3,4 µg/L	0,9 µg/L	Bebidas energéticas	BRAUNRATH <i>et al.</i> , 2005

Fonte: O autor, 2019.

Legenda: <sup>1</sup> Extração em fase sólida combinado com cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. <sup>2</sup> Coluna Sol-Gel de imunoafinidade combinado com cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à fluorescência. <sup>3</sup> Microextração por fase sólida no *headspace* combinado com cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massa. <sup>4</sup> Microextração por fase sólida no *headspace* combinado com cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massa com derivatização. <sup>5</sup> Extração por imunoafinidade Coluna de imunoafinidade combinado com cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à fluorescência. LOD: Limite de Detecção. LOQ: Limite de Quantificação.

Dependendo da natureza da matriz a extração do bisfenol A poderá exigir tratamentos distintos que incluem pré-tratamento, extração, purificação, concentração e, em alguns casos, derivatização. A extração com solventes é a técnica mais recorrente para a separação do bisfenol A de amostras sólidas, enquanto a EFS é a mais comum para amostras líquidas. Os extratos com bisfenol A comumente necessitam da limpeza, sendo assim, a extração líquido-líquido (ELL) e EFS são as mais usadas. A remoção de proteínas por precipitação quase sempre é necessária e, para isso, a acetonitrila é o solvente preferencial (BALLESTEROS-GÓMEZ; RUBIO; PÉREZ-BENDITO, 2009; CAO, 2010).

A extração de bisfenol A das matrizes alimentares ou de fluidos corporais usando solventes é uma prática comum, sendo a acetonitrila o solvente predominante. O *n*-hexano, *n*-heptano e trimetilpentano têm sido usados juntamente com a acetonitrila para extrair bisfenol A de alimentos ricos em lipídios. Porém o uso de outros solventes como clorofórmio, diclorometano e metanol também tem sido observado. O uso de cartuchos de extração para *clean-up* é uma etapa recorrente a fim de remover os interferentes, sendo o Oasis HLB (Hidrofílica-Lipofílica) e C<sub>18</sub> (octadecilsiloxano), os cartuchos de fase sólida mais usuais. As colunas de imunoafinidade também são usadas para extrair bisfenol A e limpar os extratos a partir da extração com solventes (CAO, 2010).

Nos últimos anos o método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*) tem sido uma alternativa, pois apresenta como vantagens ser um método rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). O método criado teve o objetivo de superar limitações práticas para a extração de agrotóxicos a partir de legumes e frutas, mas seu uso se expandiu para outras matrizes. Originalmente, o método foi baseado na extração usando acetonitrila, acompanhado por uma partição líquido-líquido após a adição de sais e de uma extração em fase sólida dispersiva (D-SPE) (*Dispersive Solid Phase Extraction*). O efeito *salting-out*, promovido pela adição dos sais, objetivava melhorar a recuperação de analitos polares, uma vez que a adição de sais diminui a solubilidade das substâncias polares na fase aquosa, assim como a quantidade de água na fase orgânica e vice-versa. A etapa de limpeza (*clean-up*) é fundamental, visto que remove coextrativos presentes na matriz que poderiam interferir nas análises (PRESTES *et al.*, 2009).

Tradicionalmente, eram empregados EFS, mas no novo método o extrato é colocado em contato com uma mistura contendo 25 mg do sorvente amina primária-secundária (PSA) (*primary secondary amine*) e 150 mg de sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>). O sorvente retém as interferências da matriz e após agitação manual e centrifugação o extrato está pronto para ser injetado no sistema cromatográfico (PRESTES *et al.*, 2009).

Outra etapa muito comum nas análises de bisfenol A é a derivatização devido a presença dos dois grupos hidroxil do bisfenol A. Muitos derivatizantes podem ser usados como o anidrido acético e *N-O*-Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) em análise por CG-EM em modo de ionização por impacto de elétrons e os derivatizantes ácido de anidrido pentafluoropropiônico, brometo de pentafluorbenzila e cloreto de pentafluorozoila também em análise por CG-EM no modo de ionização por impacto de elétrons. Já em cromatografia líquida acoplada à fluorescência o reagente de escolha tem sido o 4-(4,5-difenil-imidazol-2-il) cloreto de benzoila (DIB-Cl) (CAO, 2010). A etapa de concentração por evaporação do solvente é de suma importância por causa da baixa concentração do analito em alimentos. A filtração e a reconstituição com solvente orgânico completam o tratamento da amostra.

Em relação à separação e detecção, fazem-se necessários métodos sensíveis e seletivos, uma vez que o contaminante está presente em quantidades traços, por isso os mais comuns são a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (CLAE-FL), a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (CLAE-EM), cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massa sequencial (CLUE-EM/EM) e a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM), ainda que a cromatografia líquida de alta eficiência com detector eletroquímico (CLAE-DE) e o imunensaio sejam também aplicáveis (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2012; BALLESTEROS-GÓMEZ; RUBIO; PÉREZ-BENDITO, 2009).

A cromatografia é um método de separação dos componentes de uma mistura, realizado por meio da distribuição destes em duas fases imiscíveis. Uma fase se move enquanto a outra continua estacionária. A fase móvel ao passar pela fase estacionária permite a distribuição dos componentes da mistura pelas duas fases, de tal maneira que cada um deles é seletivamente retido, em consequência são geradas velocidades diferentes de migração no sistema cromatográfico. Dependendo do estado físico da fase móvel a cromatografia pode ser dividida em cromatografia gasosa (gás inerte), líquida e supercrítica (vapor pressurizado) (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Não há uma técnica padrão-ouro estabelecida, porém a cromatografia líquida oferece a vantagem da simplicidade sobre a cromatografia gasosa para o qual a etapa de derivatização é necessária (BALLESTEROS-GÓMEZ; RUBIO; PÉREZ-BENDITO, 2009). A CLAE-EM/EM provê maior confiança na identificação do pico baseado no espectro de massa. Tanto a ionização por *eletrospray* por íons negativos (*ESI*) como ionização química à pressão atmosférica (*APCI*) apresentam como íon mais abundante no espectro de massa do bisfenol A o  $[M-H]^-$   $m/z$  227 que é usado para a quantificação na CLUE-EM/EM. Os íons de fragmento

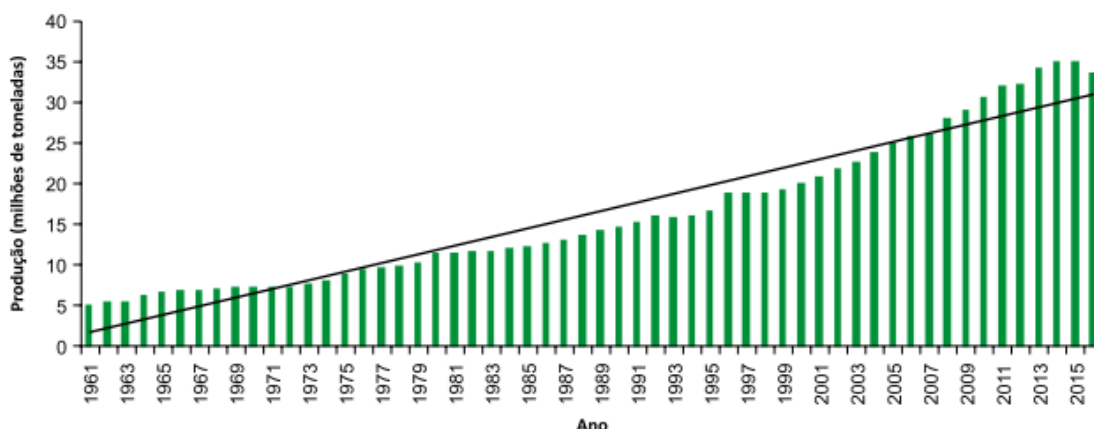
m/z 212 e 133 são os produtos mais proeminentes dos fragmentos obtidos por CLUE-EM/EM, por isso, são usados para a quantificação e confirmação do bisfenol A (SHAO *et al.*, 2005).

### 1.10 Leite

Brasil, em 2017, foi o quinto maior produtor de leite do mundo, tendo produzido mais de 23 milhões de toneladas (DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA DOS ESTADOS UNIDOS - *United States Department of Agriculture – USDA*) (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2018). As projeções do mercado internacional para o Brasil são favoráveis, pois no país a produção têm apresentado resultados positivos nos últimos 54 anos como apresentado no Gráfico 1.

O leite de vaca continua sendo o leite de maior produção mundial tendo atingido mais de 811 milhões de toneladas de litros em 2017 (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2018). Em relação ao Brasil, o IBGE estimou que a produção nacional tenha atingido 33,6 milhões de toneladas em 2016 (VILELA *et al.*, 2017).

Gráfico 1 - Produção de leite no Brasil de 1961 a 2015



Fonte: VILELA *et al.*, 2017.

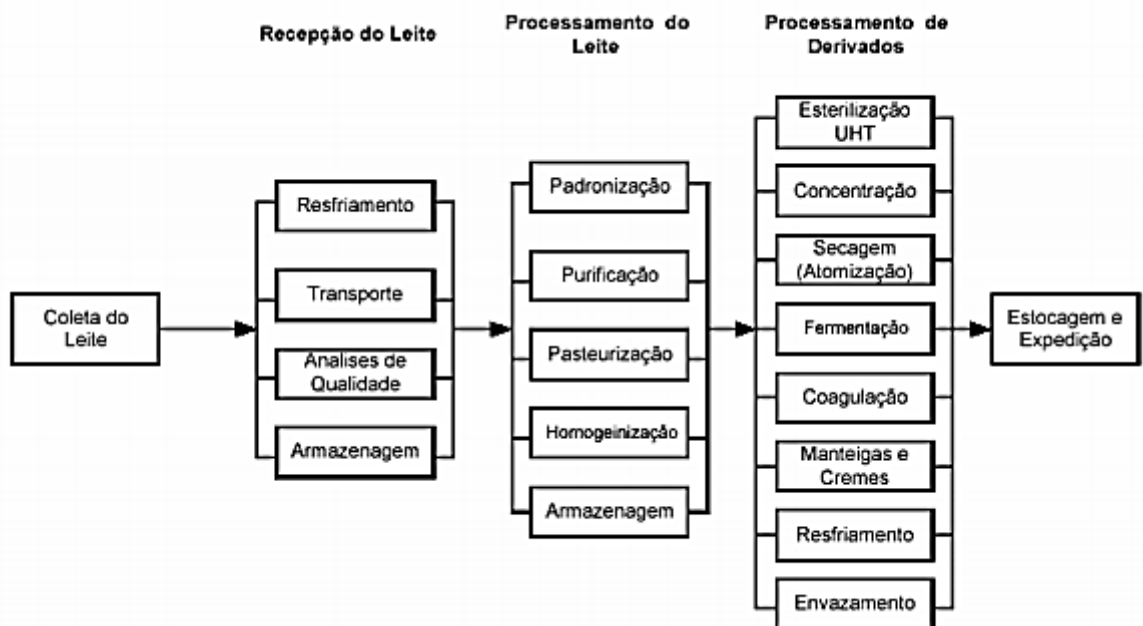
Dentre os Estados da Federação Minas Gerais se apresenta como o maior produtor, sendo responsável por mais de 26% da produção nacional, seguido de Rio Grande do Sul, São Paulo, Santa Catarina, Goiás e Bahia (EMBRAPA, 2017; IBGE, 2017).

Segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), as exportações brasileiras do agronegócio atingiram US\$ 9,21 bilhões em junho de 2018 com

participação de mais de US\$ 4 milhões das exportações com os derivados lácteos. O agronegócio leite ocupa um espaço de destaque pela sua importância social e pela sua distribuição em todo território nacional, gerando milhões de empregos diretos e indiretos (FEDERAÇÃO DAS INDÚSTRIAS DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2018).

Essa importância está relacionada com o grande valor nutricional que o leite e seus derivados apresentam, uma vez que são fontes de proteínas de alto valor biológico, minerais e vitaminas. O Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) entende leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2017a). A Figura 8 apresenta o fluxograma das operações na produção de leite e seus derivados.

Figura 8 - Desenho esquemático do fluxograma das operações associadas ao beneficiamento do leite



Fonte: VENTURIN; SARCINELLI; SILVA, 2007.

Segundo a Instrução Normativa (IN) nº 77, de 26 de novembro de 2018, a etapa de recepção do leite é de extrema importância para a manutenção da qualidade físico-química. O resfriamento é uma medida eficaz para a contenção da acidificação causada pelo crescimento das bactérias lácteas, para isso são usados sistemas de pré-resfriamento ou tanques de expansão direta (tanques de depósito ou refrigeração) em aço inoxidável. O transporte de leite cru refrigerado deve ser feito em carros-tanques isotérmicos, em aço inoxidável, das propriedades rurais até os estabelecimentos industriais em sistema fechado. Para isso são usadas mangueiras e bombas sanitárias, a fim de

recolher o produto diretamente do tanque de refrigeração, porém também é permitido o transporte em latões. A armazenagem deve ser feita em tanques de armazenagem com controle de temperatura ( $\leq 4,0^{\circ}\text{C}$ ). A etapa de padronização é feita por desnatadeiras centrífugas que retiram parcialmente a gordura do leite, mantendo constante o teor no produto final (BRASIL, 2018a).

O processamento pode ser feito para produção de leite para consumo (leite pasteurizado, leite esterilizado ou leite ultra alta temperatura - UAT ou UHT) e produção de derivados. O tratamento térmico é aplicado ao leite com o objetivo de evitar perigos à saúde pública decorrentes da ação de microrganismos patogênicos. Quanto à pasteurização, ela pode ser de dois tipos: pasteurização lenta e rápida. No primeiro tipo é aplicado ao leite um aquecimento indireto entre  $63^{\circ}\text{C}$  e  $65^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos, sendo mantido o leite sob agitação mecânica e lenta, em aparelhagem própria e no segundo o aquecimento ocorre em camada laminar entre  $72^{\circ}\text{C}$  e  $75^{\circ}\text{C}$  pelo período de 15 a 20 segundos, em aparelhagem própria. Em relação à esterilização, é aplicada ao leite uma temperatura entre  $110^{\circ}\text{C}$  e  $130^{\circ}\text{C}$  pelo período de 20 a 40 minutos, em equipamentos próprios. Já no processo UAT é aplicada uma temperatura entre  $130^{\circ}\text{C}$  a  $150^{\circ}\text{C}$  pelo período de 2 a 4 segundos, mediante processo de fluxo contínuo (BRASIL, 2017a).

A homogeneização tem o objetivo de prolongar a estabilidade da emulsão de gordura, reduzindo mecanicamente o tamanho dos glóbulos, além de melhorar a digestibilidade do produto. O processo consiste em diminuir mecanicamente o tamanho dos glóbulos de gordura, para menos de  $1,0\ \mu\text{m}$ , de forma a retardar sua separação espontânea (FERREIRA, 2007). Após a homogeneização o leite pasteurizado ou esterilizado podem ser envasados automaticamente em circuito fechado e expedido para consumo ou armazenados em câmara frigorífica. Porém, o leite UAT deve ser imediatamente resfriado a menos de  $32^{\circ}\text{C}$  e envasado sob condições assépticas em embalagens esterilizadas e hermeticamente fechadas (BRASIL, 2017a).

O Regulamento estabelece parâmetros de qualidade para produtos de origem animal, entre eles o leite e derivados, que abrange: contagem de células somáticas (CCS); contagem bacteriana total (CBT); composição centesimal; detecção de resíduo de produtos de uso veterinário e outras que venham a ser determinadas em norma complementar (BRASIL, 2017a). A CCS no leite determina a qualidade do leite cru e, conseqüentemente, monitora a sanidade da glândula mamária. Já a CBT é usada para determinar a quantidade de bactérias aeróbias mesófilas, ou seja, avalia o crescimento de bactérias viáveis nas condições de cultivo; enquanto a detecção de resíduo de produtos de uso veterinário tem sido nos últimos anos, um dos maiores desafios impostos à indústria de alimentos lácteos, pois eles podem interferir no rendimento de alguns produtos, além da possibilidade de causar hipersensibilidade em humanos e resistência à antibioticoterapia e, ainda são considerados indesejáveis pelos consumidores (LANGONI *et*

al., 2011). Outro parâmetro usado na caracterização da qualidade do leite é a composição centesimal de seus principais constituintes. Portanto, o RIISPOA considera leite o produto que atenda as especificações apresentadas na Tabela 3.

A IN nº 76, de 26 de novembro de 2018, que aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A subdivide o leite segundo o seu teor de gordura em: leite integral (mínimo de 3,0 g gordura/100 g); leite semidesnatado (0,6 a 2,9 g de gordura/100 g) e leite desnatado (máximo de 0,5 g de gordura/100 g) (BRASIL, 2018b).

Tabela 4 - Características físico-químicas do leite cru (%), segundo RIISPOA

<b>Característica físico-química</b>	<b>Teor mínimo</b>
Gordura (g)	3,0
Proteína (g)	2,9
Lactose (g)	4,3
Sólidos não gordurosos (g)	8,4
Sólidos totais (g)	11,4
Acidez titulável (g de ácido láctico/100mL)	0,14 e 0,18
Densidade relativa a 15°C (g/mL)	1,028 e 1,034
Índice crioscópico (grau Hortvet - °H)	-0,530°H e -0,555°H

Fonte: BRASIL, 2017a.

A recomendação na ingestão diária destes alimentos está relacionada ao consumo de cálcio, um mineral essencial para a formação e a manutenção da estrutura óssea, além de desempenhar outras funções no organismo. As necessidades de crianças de 3 e de 4 a 8 anos são atendidas com ingestão diária de cálcio de 500 mg e 800 mg, respectivamente. Já os pré-escolares (1 a 6 anos) e os escolares (7 a 14 anos), o atendimento das necessidades desse mineral requer o consumo de 3 copos (600 ml) e de 2 a 3 copos (400 ml a 600 ml) de leite por dia, respectivamente. A necessidade de cálcio por dia para os adolescentes de ambos os sexos é de 1.300 mg e, entre idosos, de 1.200 mg. As necessidades de cálcio para gestantes também são maiores: adolescentes grávidas, 1.300 mg/dia, e gestantes adultas, 1.000 mg/dia. A recomendação geral do MS é o consumo diário de três porções de leite e derivados (BRASIL, 2006). No guia alimentar para crianças menores de dois anos a recomendação diária, para crianças desmamadas, a partir dos seis meses até os dois anos também são três porções de leite e produtos lácteos (BRASIL, 2013).

Dados da última Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2008-2009 mostraram que o consumo médio de leite integral *per capita* é maior que o leite desnatado (BRASIL, 2011b).

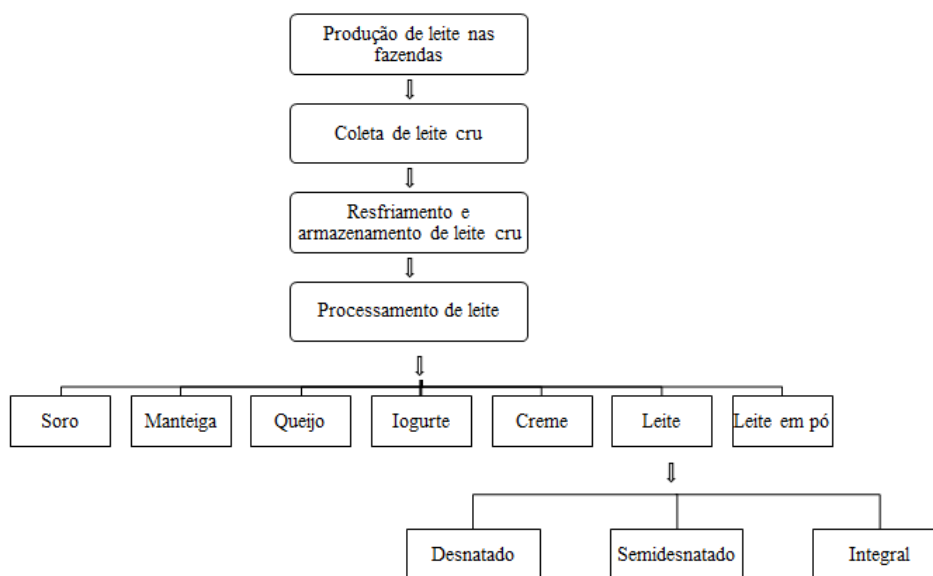
Estima-se que o Brasil irá produzir mais de 47 milhões de toneladas de leite em 2025. A demanda atual por lácteos tem crescido mais do que o crescimento da população. Isso pode estar relacionado com as mudanças nos hábitos alimentares, no poder aquisitivo e nas condições de bem-estar dos indivíduos, ocasionando uma mudança no consumo *per capita* de lácteos. A previsão da Federação das Indústrias do Estado de São Paulo (Fiesp) é que a demanda por leite longa vida e queijos cresçam até 2020 (VILELA *et al.*, 2016).

Apesar da composição adequada de nutrientes, o leite oferecido aos consumidores pode não ser puro. A contaminação por microrganismos patogênicos ou deteriorantes, por resíduos veterinários ou por disruptores endócrinos pode comprometer a qualidade do produto e, portanto, a saúde da população. A fim de evitar a contaminação microbiana e por resíduos veterinários as Instruções Normativas e Regulamentos descrevem a necessidade de testes com o objetivo de detectarem valores acima do permitido e evitarem a comercialização do produto. Entretanto, não há nenhuma obrigatoriedade na análise de disruptores endócrinos como o bisfenol A.

### 1.11 Cadeia de suprimento de laticínios e ocorrência de bisfenol A

A produção de laticínios segue vários estágios com início na alimentação do animal, seguida pela produção do leite cru na fazenda e posterior processamento como apresentado na Figura 9.

Figura 9 - Desenho esquemático da cadeia de suprimento do leite



Fonte: Adaptado de VAN ASSELT *et al.*, 2017.

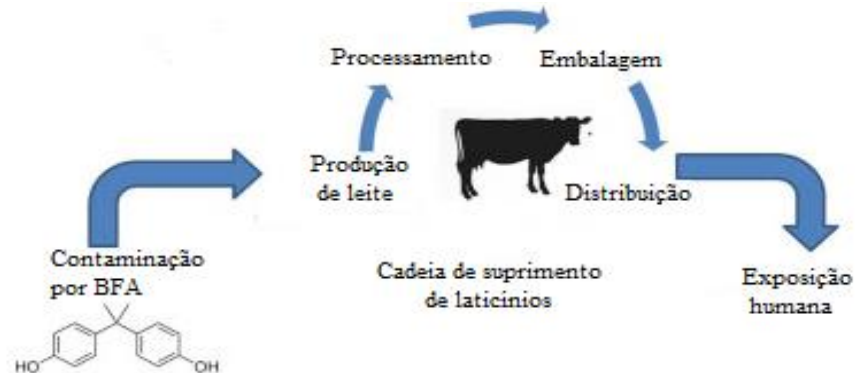


A garantia da segurança alimentar é obtida avaliando os perigos ao longo da cadeia de produção. Programas de monitoramento devem ser rigorosamente implementados como as Boas Práticas Agrícolas (BPA), Programa de Autocontrole (PAC) e o Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC). Os perigos microbiológicos, físicos e químicos devem ser controlados ao longo da cadeia produtiva, sendo os primeiros causados por agentes microbiológicos, ou seja, bactérias ou vírus que são responsáveis pelas doenças transmitidas por alimentos (DTA), os físicos ligados à presença de corpos estranhos nos alimentos e, os químicos que entram na cadeia de abastecimento através da produção primária, quando o animal ingere alimento contaminado, através da absorção de substâncias químicas como resultado do pastoreio em solos contaminados, ou através da administração de medicamentos veterinários (BRASIL, 2017a).

A qualidade na produção do leite está relacionada ao meio ambiente e depende, em grande parte, das atividades humanas. A aplicação de material contaminado no solo, como esgoto ou resíduos industriais, e a deposição atmosférica de atividades industriais próximas às fazendas produtoras resultam em uma ampla gama de contaminantes ambientais que entram na cadeia produtiva do leite. Como muito desses químicos ambientais são lipossolúveis, como o bisfenol A, eles poderão ser armazenados no tecido adiposo, secretados juntamente com a gordura do leite, podendo se acumular nos derivados lácteos ao longo da cadeia de laticínios. Além disso, o bisfenol A pode ser introduzido durante a ordenha a partir de peças plásticas (derivadas de resinas plásticas) das máquinas de ordenha, e podem ser detectados em produtos lácteos, provenientes de tubos de PVC usados durante o processo de ordenha ou também transferidos do leite a granel para tanques estocados (VAN ASSELT *et al.*, 2017).

Geralmente, no final do processamento de leite, os contaminantes já presentes no leite não são afetados por processamento adicional na fábrica de laticínios, além disso, em alguns casos, os resíduos podem ser concentrados no produto final e causar aumento nos níveis dos contaminantes. Finalmente, o bisfenol A também pode migrar como aditivo do material de embalagem para o leite ou produtos lácteos. Sendo a polimerização de monômeros raramente completa, o bisfenol A pode migrar de embalagens plásticas em níveis muito baixos, e essa migração representa uma causa adicional de contaminação da cadeia do leite (DANAHER; JORDAN, 2013). Figura 10 apresenta um esquema de contaminação do leite por bisfenol A ao longo do processo produtivo.

Figura 10 - Exposição humana ao leite e seus derivados contaminados por bisfenol A ao longo da cadeia produtiva



Fonte: Adaptado de MERCOGLIANO; SANTONICOLA, 2018.

## 1.12 Validação

Um importante aspecto a ser levado em consideração no suporte às ações de vigilância sanitária é a confiabilidade das medições analíticas dos laboratórios de saúde pública. É função do laboratório de ensaio demonstrar que os resultados adquiridos são de confiança e adequados para o propósito (SOBOLEVA; AMBRUS, 2004).

A fim de garantir informações confiáveis e interpretáveis geradas pelo método analítico de escolha é necessária uma avaliação do método. Portanto, a validação deve demonstrar que o método analítico é adequado à finalidade a que se destina e capaz de produzir resultados confiáveis (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017). O Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) estabelece os parâmetros a serem verificados: seletividade, linearidade, faixa de trabalho, efeito matriz, limite de detecção, limite de quantificação, tendência/exatidão e precisão (INMETRO, 2018).

### 1.12.1 Seletividade

A seletividade de um método analítico é a capacidade dele avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em análise na presença de componentes que possam interferir com a sua determinação mesmo em uma amostra complexa. Em um estudo de validação de um método cromatográfico, a seletividade deve ser comprovada através da pureza cromatográfica do sinal do analito, ou seja, garantir que o pico de resposta seja exclusivamente da substância de interesse, exceto para produtos biológicos (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017).

Nos métodos de identificação, a capacidade de se obter resultado positivo para a amostra contendo o analito e resultado negativo para outras substâncias presentes na amostra deve ser demonstrada (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017).

#### 1.12.2 Linearidade

A linearidade de um método analítico deve ser demonstrada através da sua capacidade na obtenção de respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra. Para isso, durante toda a faixa estabelecida para o método uma relação linear deve ser avaliada (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017).

#### 1.12.3 Faixa de trabalho

A partir dos estudos de linearidade, a faixa de trabalho é estabelecida juntamente com os resultados de precisão e exatidão, sendo dependente da aplicação pretendida (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017; INMETRO, 2018). A utilização da faixa de trabalho é definida a partir da observação do limite de restrição do analito, presente na legislação. Esta concentração deve situar-se no meio da faixa de trabalho, onde a curva analítica apresenta a menor incerteza para a determinação da concentração. Os níveis de concentração da curva analítica devem ser igualmente espaçados e preparados com três repetições genuínas (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005).

#### 1.12.4 Efeito matriz

Efeito matriz é o efeito causado pelos componentes da matriz na resposta analítica. Dessa forma, substâncias inerentes à matriz coeluem com as substâncias de interesse. Isso pode ocasionar problemas analíticos na presença da matriz comparado ao mesmo analito em solvente (INMETRO, 2018).

O paralelismo das retas é indicativo de ausência de interferência dos constituintes da matriz que deve ser demonstrado por meio de avaliação estatística adequada (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017).

Os estudos de efeitos matriz podem ser realizados com o preparo de curvas de calibração em solvente e curvas de analitos em matriz (amostras branco) com concentrações idênticas ou abrangendo a mesma faixa de concentração.

#### 1.12.5 Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)

O limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém, não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017; INMETRO, 2018). Pode ser determinado por meio de método visual, da razão sinal-ruído, baseado na determinação do branco ou parâmetros da curva de calibração (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017).

O limite de quantificação é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de exatidão e precisão sob as condições experimentais estabelecidas. Para determinar este parâmetro os mesmos procedimentos estabelecidos para o limite de detecção podem ser seguidos, sendo que a razão sinal/ruído deve ser, no mínimo, de 10:1, enquanto no limite de detecção a razão deve ser maior ou igual a 2:1 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017).

#### 1.12.6 Tendência/Exatidão

Num método analítico, a exatidão é a concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como referência (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017). Esse parâmetro pode ser expresso como percentual de recuperação, durante a determinação de uma concentração conhecida de substância em exame num meio de composição definida. Experimentos para avaliar a exatidão de um método podem ser obtidos com materiais de referências, materiais de referência certificados, métodos de referência ou realização de ensaios de recuperação. A exatidão é avaliada numericamente por meio da tendência (INMETRO, 2018).

#### 1.12.7 Precisão

A precisão pode ser definida como a quantidade de dispersão nos resultados obtidos de múltiplas análises de uma amostra homogênea. Ela pode ser analisada através da repetibilidade e da precisão intermediária. A repetibilidade é o grau de concordância entre resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição, ou seja, mesmo procedimento de medição; mesmo observador; mesmo instrumento usado sob mesmas condições; mesmo local e mesmas repetições em curto espaço

de tempo (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002; INMETRO, 2018). A precisão deve ser demonstrada pela dispersão dos resultados, calculando-se o desvio padrão relativo (DPR) da série de medições (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017).

A precisão intermediária é avaliada sob condições que possam compreender o mesmo procedimento de medição, o mesmo local e medições repetidas no mesmo objeto ou objetos similares, durante um período extenso de tempo, podendo incluir outras condições submetidas às mudanças. A precisão intermediária pode ser determinada por vários métodos como gráficos de controle do desvio padrão ou por meio de equações (INMETRO, 2018).

### **1.13 Vigilância Sanitária**

As ações preventivas são de extrema importância para as práticas médico-sanitárias. Logo, a atuação da Vigilância Sanitária sobre os fatores de risco associados a produtos, insumos e serviços relacionados com a saúde, com o ambiente e o ambiente de trabalho é a forma mais eficaz para a promoção, proteção, recuperação e reabilitação da saúde (ROZENFELD, 2000).

A Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990, definiu a Vigilância Sanitária como um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir, ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde. Essa abrangência das ações de Vigilância Sanitária com a introdução do conceito de risco se concilia com o papel atual do Estado através da sua função reguladora da produção econômica, do mercado e do consumo (BRASIL, 1990).

A sociedade moderna tem como principal característica o consumo crescente de mercadorias, bens e serviços. Desse aumento são gerados muitos riscos e danos à saúde do indivíduo e da coletividade, assim como ao meio ambiente. Portanto, as ações de Vigilância Sanitária, como definidas pela Lei Orgânica da Saúde, são inseridas no âmbito das relações sociais de produção e consumo, onde se tem origem a maior parte dos problemas de saúde (ROZENFELD, 2000).

A fim de que a Vigilância Sanitária consiga cumprir seu papel, há a necessidade dela se integrar e se articular ao conjunto de práticas sanitárias, usando diferentes instrumentos com a participação da sociedade civil. Os incontáveis riscos à saúde da população provenientes do uso de medicamentos, vacinas, alimentos, hemoderivados, agrotóxicos, cosméticos e muitos outros devem ser controlados. Ações de controle sanitário nos: a) portos,

aeroportos e fronteiras (evitando a entrada de doenças exóticas); b) na prestação de serviços (devido ao uso concomitante de novas tecnologias gerando risco à saúde); c) no manejo de resíduo de forma inadequada (evitando os potenciais efeitos nocivos dos resíduos sobre o meio ambiente, a saúde humana e animal) são algumas ações tomadas pela Vigilância Sanitária para controlar os riscos (WALDMAN, 1991).

Depois de identificados os riscos, as ações de controle podem ser tomadas. Além da legislação e fiscalização, a comunicação, a educação sanitária, os sistemas de informação, o monitoramento da qualidade de produtos e serviços, a vigilância epidemiológica de eventos adversos e vários outros instrumentos podem ser usados. Segundo Waldman (1991) o monitoramento é uma prática na área da saúde que tem o objetivo de acompanhar e avaliar, controlar mediante acompanhamento, para alertar quanto à necessidade de intervenção. Portanto, estudos que avaliem e monitorem contaminantes na cadeia produtiva são fundamentais para tomadas de decisão que protejam a saúde do indivíduo.

#### **1.14 Justificativa**

O consumo de leite e seus derivados são importantes alimentos da dieta de diferentes faixas etárias indicando que o controle sobre este produto deve ser rigoroso, a fim de se monitorar os potenciais contaminantes que indivíduos possam estar expostos.

Nos últimos anos, a comunidade científica tem demonstrado a ocorrência de efeitos adversos à saúde relacionados a substâncias que podem ser encontradas em baixas doses em alimentos. Uma dessas substâncias é o bisfenol A e, por este motivo, tem recebido destaque e preocupação das autoridades sanitárias e dos pesquisadores em todo o mundo. Apesar de muitas controvérsias sobre o tema e a falta de consenso sobre a segurança do bisfenol A, tem crescido evidências que correlacionam essa substância com efeitos deletérios à saúde.

A legislação nacional estabelece limite para a migração específica do bisfenol A, assim como a proibição de se comercializar mamadeiras que usem essa substância na sua composição. Entretanto, o conhecimento sobre a identificação das possíveis fontes de exposição ao bisfenol A, a aferição das concentrações nos diversos produtos e o nível de exposição dos indivíduos à substância é de extrema importância para a saúde pública. Vale destacar ainda que o conteúdo de bisfenol A pode sofrer uma grande variação nos mesmos alimentos encontrados em diferentes partes do mundo.

Com isto justifica-se a necessidade de pesquisas que avaliem a presença de bisfenol A em alimentos consumidos pela população brasileira. Considerando que não há nenhum estudo

no país voltado para monitorar a presença de bisfenol A em alimentos, o presente estudo busca contribuir com a Vigilância Sanitária através de dados que possam servir como formas para o monitoramento da presença e dos níveis desta substância em leite bovino.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar a contaminação de leite fluído integral e leite em pó integral por bisfenol A.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Otimizar e validar um método analítico para determinação de bisfenol A em leite fluído integral (UAT e pasteurizado) e leite em pó integral por QuEChERS e CLUE-EM/EM;
- Aplicar o método analítico validado na análise de amostras de leite fluído integral (UAT e pasteurizado) e leite em pó integral provenientes de mercados da região metropolitana do Rio de Janeiro, RJ;
- Determinar a concentração de bisfenol A nas amostras de leite integral analisadas;
- Avaliar a exposição ao bisfenol A proveniente do consumo de leite integral contaminado.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Vidrarias:

- a) Balões volumétricos de capacidades: 1, 2, 5 e 10 mL;
- b) Béqueres de vidro de capacidades: 10, 20, 100 e 200 mL;
- c) Erlenmeyers de vidro com tampa esmerilhada de capacidades de: 40 e 50 mL;
- d) Espátulas de metal;
- e) Frascos de vidro graduado com tampa de capacidades: 5, 10, 100 e 200 mL;
- f) Naveta pequena;
- g) Pipetas Pasteur;
- h) Provetas volumétricas de capacidade: 5, 10, 50 e 100 mL;
- i) Seringas de vidro de capacidade: 5 mL.

As vidrarias e outros materiais, como, por exemplo, as ponteiros das pipetas, usados no estudo foram submetidos aos seguintes procedimentos para garantir a ausência de bisfenol A:

- a) Descontaminação do material com etanol P.A;
- b) Lavagem em água corrente;
- c) Imersão do material lavado em solução de detergente alcalino (Extran 5% (1:1, v/v)) por, no mínimo, 12 horas;
- d) Lavagem em água corrente;
- e) Lavagem com água ultrapura (MILLI-Q);
- f) Sonificação em MeOH (grau CLAE) por 15 minutos repetindo procedimento duas vezes;
- g) Secagem do material em nitrogênio;
- h) Frascos de vidro usados para acondicionar as alíquotas de análise foram ainda tratados em um forno Mufla a 400°C durante a noite;
- i) Guarda do material em local fechado e separado.

Cabe informar que as membranas de filtração descartáveis (Filtro Millipore® Millex-FG Hidrofóbico PTFE 0,2 µm) não passaram por este tratamento, sendo desprezadas após o uso. A análise de uma solução filtrada de MeOH/H<sub>2</sub>O (80:20, v/v) mostrou a ausência de bisfenol A nas membranas de filtração descartáveis, sendo então usados durante as análises.

#### Equipamentos e Acessórios:

- a) Agitador de tubos (Marconi, MA 162);
- b) Balança analítica (Sartorius, LP 620P);
- c) Banho Ultrassônico (Branson, 2510);
- d) Bomba a vácuo;
- e) Capela de exaustão;
- f) Centrífuga com refrigeração e capacidade para 10000 rpm (Eppendorf, 5804r);
- g) Cromatógrafo Líquido de Ultra Eficiência (CLUE) – Waters, UPLC™ I-Class ACQUITY™ (Estados Unidos);
- h) Disco/Filtro ENVI™- 18 DSK 47mm – Sigma-Aldrich (Pennsylvania, Estados Unidos);
- i) Espectrômetro de massas sequencial quadrupolo *tandem* - Waters, Xevo® TQ-S (Estados Unidos);
- j) Forno Mufla;
- k) Filtro Millipore® Millex-FG Hidrofóbico PFTE 0,2 µm (membranas de filtração descartáveis);
- l) Micropipetador automático de capacidade: 2-10 µL, 20-100 µL; 100-1000 µL;
- m) Modulo triplo de aquecimento/Agitação com unidade de evaporação (Reacti-Therm III, 18935/Reacti-Vap III, 18785);
- n) Ponteiras de capacidade: 2-200 µL e 50-1000 µL;
- o) Refrigerador para amostras;
- p) Refrigerador para soluções e reagentes;
- q) Sistema de filtração à vácuo;
- r) Tubos Falcon PP 15 mL.

#### Reagentes, solventes e padrão utilizados:

- a) Acetona grau CLAE (grau de pureza 99,4%) - J.T. Baker (Philipsburg, Estados Unidos);
- b) Acetonitrila grau CLAE (grau de pureza 99,9%) - Merck (Darmstadt, Alemanha);
- c) Água ultrapura (MILLI-Q, Milipore®);
- d) Amina Primária Secundária (Primary Secondary Amine – PSA) - Agilent Technologies – (Santa Clara, Estados Unidos);
- e) Cloreto de sódio (grau de pureza 100%) - Merck (Darmstadt, Alemanha);

- f) Etanol comercial;
- g) Hexano grau CLAE (grau de pureza 95%) - J.T. Baker (Pennsylvania, Estados Unidos);
- h) Hidróxido de amônio 25% - Merck (Darmstadt, Alemanha);
- i) Metanol grau CLAE (grau de pureza 99,9%) - Tedia (Fairfield, Estados Unidos);
- j) Octadecilsiloxano C<sub>18</sub> (ODS) - Agilent Technologies - (Santa Clara, Estados Unidos);
- k) Padrão de Bisfenol A (grau de pureza de 99%) - Sigma-Aldrich (Pennsylvania, Estados Unidos);
- l) Sulfato de magnésio (grau de pureza 98%) - Merck (Darmstadt, Alemanha).

O preparo das soluções-padrão usadas no estudo iniciou-se a partir da solução estoque. A solução estoque de bisfenol A (S<sub>1</sub>) de concentração 1000 µg/mL foi preparada a partir da solubilização de 10 mg ± 0,1 do padrão de bisfenol A (99% m/m) em metanol (MeOH), utilizando balão volumétrico de 10 mL. A solução foi acondicionada em frasco de vidro e armazenada sob refrigeração (5°C e 10°C).

Foi preparada uma solução intermediária (S<sub>2bisfenol A</sub>) contendo o bisfenol A, medindo-se com auxílio de micropipeta automática calibrada, uma alíquota de volume nominal igual a 20 µL da solução S<sub>1bisfenolA</sub>, transferindo-a para um balão volumétrico de 2 mL, avolumando com MeOH, obtendo-se uma solução de interesse a uma concentração de 10 µg/mL;

Solução intermediária (S<sub>3bisfenolA</sub>) de concentração 5 µg/mL: 1000 µL da solução S<sub>2bisfenolA</sub> foram transferidos para um balão volumétrico de 2 mL calibrado, avolumado com MeOH;

Solução intermediária (S<sub>4bisfenolA</sub>) de concentração 1 µg/mL: 200 µL da solução S<sub>2bisfenolA</sub> foram transferidos para um balão volumétrico de 2 mL calibrado, avolumado com MeOH;

Solução intermediária (S<sub>5bisfenolA</sub>) de concentração 0,5 µg/mL: 100 µL da solução S<sub>2bisfenolA</sub> foram transferidos para um balão volumétrico de 2 mL calibrado, avolumado com MeOH.

Solução intermediária (S<sub>6bisfenolA</sub>) de concentração 0,05 µg/mL: 100 µL da solução S<sub>4bisfenolA</sub> foram transferidos para um balão volumétrico de 2 mL calibrado, avolumado com MeOH.

Solução intermediária (S<sub>7bisfenolA</sub>) de concentração 0,005 µg/mL (5 ng/mL): 10 µL da solução S<sub>4bisfenolA</sub> foram transferidos para um balão volumétrico de 2 mL calibrado, avolumado com MeOH.

### 3.1 Otimização das condições CLUE-EM/EM

As condições do espectrômetro de massas foram otimizadas por infusão de solução padrão de bisfenol A (50 ng/mL) preparada em MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1, v/v). A detecção em modo de ionização positivo e negativo por *electrospray ionization* (ESI) foi estudado. A escolha do modo de ionização é baseada na propriedade química da substância, como o bisfenol A apresenta facilidade de perder um hidrogênio devido ao caráter ácido que possui, a melhor resposta foi obtida quando o equipamento foi operado em modo de ionização negativo.

A partir dos íons precursores selecionados nos trabalhos consultados (RODRIGUES-GÓMEZ *et al.*, 2015; SHAO *et al.*, 2005, 2007) foram otimizadas as voltagens adequadas do cone para se obter um sinal com intensidade máxima para cada íon. A voltagem do cone foi otimizada e íons protonados [M + H]<sup>+</sup> foram selecionados para a substância alvo. As energias de colisão foram otimizadas para as principais transições identificadas. As duas transições de íons mais intensas, selecionadas através da relação sinal/ruído dos picos cromatográficos, foram usadas como as transições de quantificação e confirmação.

A energia do capilar foi avaliada na faixa de 0 a 4 kV. A temperatura do gás de dessolvatação (N<sub>2</sub>) foi avaliada na faixa de 200 a 500 °C e temperatura de fonte de 150°C. O fluxo do gás de dessolvatação (N<sub>2</sub>) foi avaliado na faixa de 300 a 1200 L/h. O fluxo do gás do cone (N<sub>2</sub>) foi avaliado na faixa de 150 a 300 L/h. As energias de colisão de 15 e 20 V foram usadas para as transições de quantificação e de qualificação, respectivamente.

Dois sistemas de fase móvel foram avaliados para desenvolvimento do método: acetonitrila-água (ACN/H<sub>2</sub>O) e MeOH/H<sub>2</sub>O. A variável analisada neste teste foi a melhor resposta analítica usando os diferentes solventes e, a partir da resposta, a melhor proporção entre os dois solventes, sempre em condições isocráticas. Em função da resposta cromatográfica ao eluente, avaliou-se também a influência do fluxo de fase móvel baseado na melhor condição de sensibilidade. A adição hidróxido de amônio na fase móvel tem sido observada na literatura (YOUNG; MALLET, 2012), por esse motivo também foi avaliado o efeito da adição de 0,1% de hidróxido de amônio na fase móvel MeOH/H<sub>2</sub>O (60:40). O efeito de memória (*carryover*) foi avaliado com injeção de solvente após solução padrão 5 ng/mL de bisfenol A.

A verificação do aumento do sinal foi realizada com injeção de padrão de 5 ng/mL em triplicata (mesma solução). Ainda foi testada uma etapa de *clean-up* com uso de PSA e C<sub>18</sub> para diminuir a carga de substâncias não desejadas presentes no extrato e conseqüentemente eliminar o efeito de aumento de sinal. Também, foram testados diferentes solventes e tempos

de lavagem com a análise de solução de bisfenol A a 5 ng/mL, avaliando-se em triplicata as condições realizadas que foram:

- a) Diferentes tempos de corrida no método isocrático utilizando MeOH/H<sub>2</sub>O (70:30) – tempo variou de 1,5 minutos a 5,0 minutos;
- b) Alteração do solvente de limpeza para 100% de MeOH, após corrida por 5,0 minutos; e para solvente de lavagem ACN:MeOH:isopropanol:H<sub>2</sub>O (1:1:1:1, v/v/v/v), no final da corrida por 5,0 minutos.

Foram também testados diferentes volumes de injeção (1 a 10 µL) usando a solução padrão de 1,0 ng/mL de bisfenol A.

### **3.2 Otimização das condições de tratamento da amostra**

As amostras para análise de bisfenol A na sua forma livre foram preparadas baseando-se no método QuEChERS descrita por Przybylski e Segard (2009) e Sartori *et al.* (2015) a fim de se obter um método eficiente para extração do bisfenol A no menor tempo de análise. A eficiência do método de tratamento de amostra selecionado nesse estudo foi inicialmente avaliada pela análise de seis amostras de leite em pó fortificadas com bisfenol A em um nível de concentração de 50 ng/mL (leite reconstituído 1:10). Foram testadas também diferentes misturas de solvente a base de MeOH/H<sub>2</sub>O para ressuspensão. As seguintes composições de MeOH/H<sub>2</sub>O: 50:50; 70:30; 75:25; 80:20; 90:10; 100:0 (v/v) foram testadas. Além disso, foram analisadas a influência da adição de ácido fórmico 0,1% e hidróxido de amônio 0,1% no solvente de ressuspensão.

### **3.3 Tratamento do material utilizado para eliminação de contaminantes**

A análise de contaminantes de distribuição ubíqua em níveis de traço exigem a verificação e eliminação da possível contaminação dos materiais utilizados durante o processo analítico, objetivando evitar a geração de resultados falso-positivos oriundos desses materiais.

Todos os insumos foram testados para a presença de bisfenol A. Dos insumos químicos usados na etapa de tratamento da amostra somente hexano, sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>) e cloreto de sódio (NaCl) apresentaram resíduos de bisfenol A.

Os sais usados no método QuEChERS (MgSO<sub>4</sub> e NaCl) passaram a ser calcinados durante a noite a temperatura de 400°C antes de serem usados e mantidos acondicionados em frascos de vidro fechados. O hexano foi filtrado em sistema de filtração a vácuo usando

membrana (ENVI<sup>TM</sup>- 18 DSK 47mm – Sigma-Aldrich). Após esses procedimentos não foram observados problemas de contaminação nos brancos de método.

Ensaio de migração foram realizados com seringas descartáveis a base de polímero (seringa tuberculina e insulina) a fim de verificar a contaminação por bisfenol A. Duas análises foram realizadas nas seringas: 1) os corpos cilíndricos das seringas foram mantidos imersos em solução MeOH/H<sub>2</sub>O (80:20, v/v) por 50 minutos. Após esse tempo uma alíquota da solução (1 mL) foi transferida para vial, sem etapa de filtração ou secagem, e levada ao CLUE-EM/EM; 2) os êmbolos foram deixados imersos em solução MeOH/H<sub>2</sub>O (80:20, v/v) por 50 minutos. Em seguida uma alíquota (1 mL) foi transferida para vial, sem etapa de filtração ou secagem, e levada ao CLUE-EM/EM.

### 3.4 Condições instrumentais

Cromatógrafo Líquido de Ultra Eficiência (CLUE) modelo UPLC<sup>TM</sup> I-Class ACQUITY<sup>TM</sup> (Waters, EUA). Utilizou-se coluna Acquity<sup>TM</sup> UPLC BEH C<sub>18</sub> (100 mm x 2,1 mm d.i., tamanho de partícula de 1,7 µm) como fase estacionária. A temperatura da coluna foi mantida a 35°C e a taxa de fluxo da fase móvel foi ajustada em 0,3 mL/min. Solução de metanol e água (MeOH/H<sub>2</sub>O) na proporção (70:30) foi usada como fase móvel num gradiente de eluição isocrático, com lavagem ACN:MeOH:isopropanol:H<sub>2</sub>O (1:1:1:1, v/v/v/v), no final da corrida por 5,0 minutos e, estabilização na condição inicial por 5,0 minutos. O volume de injeção foi de 5 µL. A detecção do analito foi realizada usando um espectrômetro de massa de quadrupolo *tandem* (Waters, Xevo® TQ-S) equipado com uma fonte de ionização por *electrospray* (ESI). Os parâmetros de fonte otimizada foram voltagem no capilar de 2 kV, temperatura de dessolvatação de 400°C e temperatura de fonte de 150°C. O argônio foi usado como o gás de colisão em fluxo de 0,15 mL/min. O nitrogênio foi utilizado como gás de dessolvatação e gás do cone nos fluxos de 750 L/h e 150 L/h, nesta ordem. Energias de colisão de 15 e 20 V foram usadas para as transições de quantificação (m/z 227>212) e de qualificação (m/z 227>133), respectivamente.

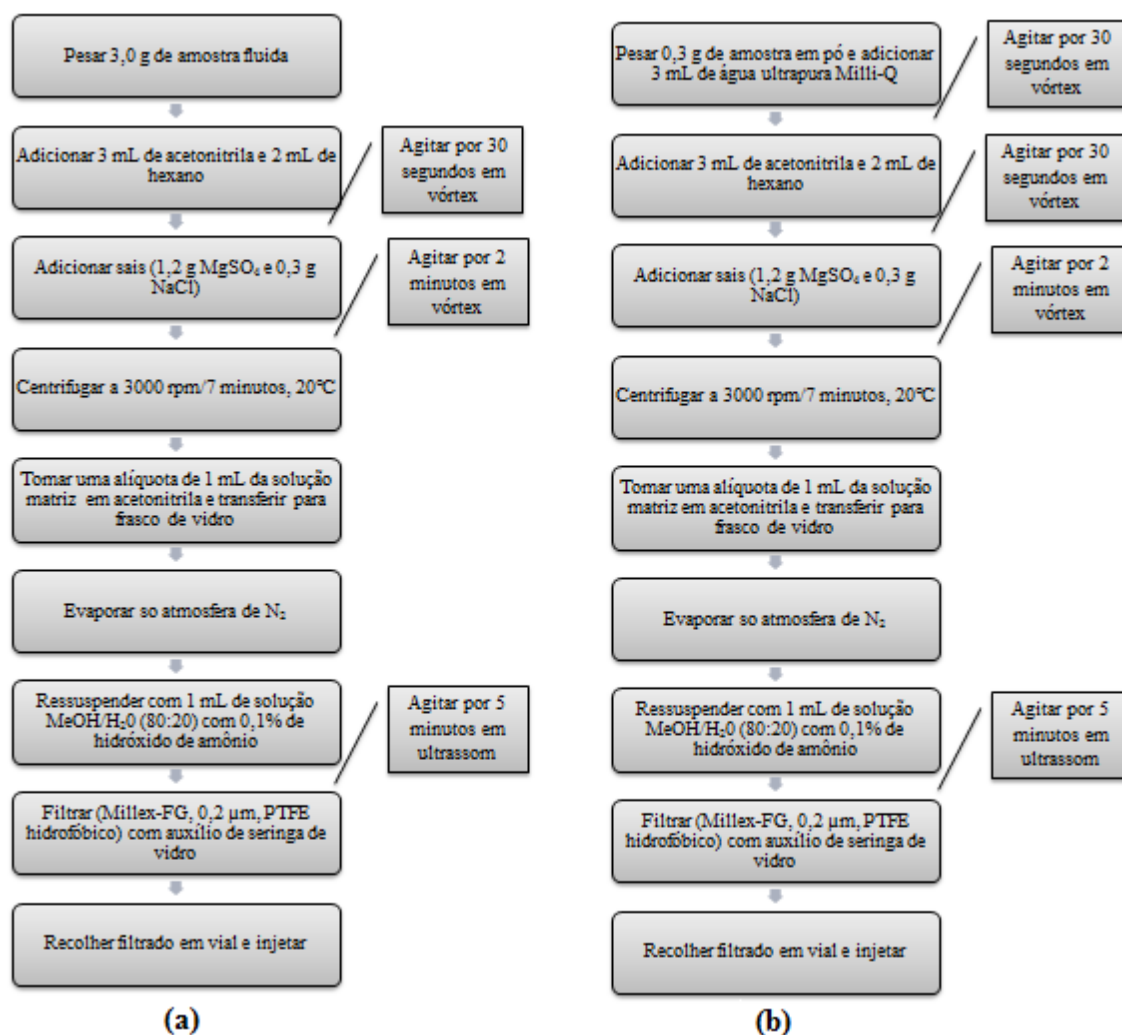
### 3.5 Preparo das amostras

Três gramas de leite fluido ou 0,3 g de leite em pó foram pesados em tubo Falcon de 15 mL. No caso de leite em pó foram ainda adicionados 3 mL de água ultrapura Milli-Q e o tubo Falcon agitado por 30 segundos em vórtex. Em seguida foram adicionados 3 mL de

acetonitrila e 2 mL de hexano filtrado e o tubo Falcon agitado por 30 segundos. Após, 1,2 g de  $\text{MgSO}_4$  e 0,3 g de NaCl foram adicionados e o tubo Falcon agitado por 2 minutos em vórtex. As amostras foram submetidas a centrifugação nas seguintes condições: 3000 rpm/7 minutos a  $20^\circ\text{C}$ , seguindo separação da fase orgânica (hexano), extrato em acetonitrila, sais e água. A fase sobrenadante (hexano) foi descartada e procedeu-se a separação e manutenção apenas da camada intermediária (extrato em acetonitrila). Uma alíquota de 1 mL do extrato em acetonitrila foi transferida para frasco de vidro e evaporado até secagem total por fluxo de gás  $\text{N}_2$ . Ressuspendeu-se o extrato seco em 1 mL de MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  (80:20, v/v) com 0,1% de hidróxido de amônio que foi levado para ultrassom por 5 minutos. Em seguida procedeu a filtração em membrana de filtração descartável (Millex-FG,  $0,2\ \mu\text{m}$ , PTFE hidrofóbico) com auxílio de seringa de vidro, recolhendo o extrato filtrado diretamente em vial para análise instrumental.

Ao final o método de preparo ficou estabelecido conforme demonstrado na Figura 11.

Figura 11 - Desenho esquemático do método para determinação de bisfenol A em amostras (a) de leite fluido integral (UAT e pasteurização) e (b) leite em pó integral



Fonte: O autor, 2019.

### 3.6 Validação do método

#### 3.6.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada através da ausência de sinais de interferência eluídos no mesmo tempo de retenção do bisfenol A, para isso foi usada amostra de leite em pó integral fortificada com 0,5 ng/mL de bisfenol A e amostra não fortificada. A seletividade do método foi determinada através da análise do perfil cromatográfico obtido da amostra de leite em pó integral reconstituída (1:10) fortificada com 0,5 ng/mL de bisfenol A e da amostra de leite em pó integral reconstituída (1:10) não fortificada. De maneira ideal a matriz não deve



apresentar interferentes que coincidam com os tempos de retenção ( $t_R$ ) da substância investigada que no caso do estudo foi o bisfenol A.

### 3.6.2 Linearidade

A curva analítica em solvente foi preparada a partir de uma solução de 1,0 µg/mL de bisfenol A ( $S_{4\text{bisfenolA}}$ ) em MeOH. A solução intermediária de 5 ng/mL da substância de interesse foi preparada, transferindo-se uma alíquota de 10 µL da solução de 1,0 µg/mL para um balão volumétrico de 2 mL calibrado, avolumado com MeOH. Cinco soluções de trabalho (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 ng/mL) foram preparadas medindo-se volumes apropriados (100 µL; 200 µL; 300 µL; 400 µL e 500 µL) da solução intermediária preparada, respectivamente. Os volumes finais das soluções foram ajustados em volume de 1 mL com MeOH/H<sub>2</sub>O (80:20) com 0,1% de hidróxido de amônio. Após o preparo das cinco soluções de trabalho, foi analisada uma alíquota de 5 µL de cada solução no CLUE-EM/EM.

A avaliação tem sequência com a aplicação do método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) que incluiu a estimativa dos parâmetros da regressão e tratamento de valores extremos. Nessa etapa foram avaliadas as respostas obtidas para as soluções padrão preparadas; estimativa da inclinação, interseção, resíduos da regressão, respectivas variâncias e  $R^2$ ; inspeção visual dos dados; construção e inspeção visual do gráfico dos resíduos da regressão em comparação com a concentração do analito; investigação e exclusão de valores extremos (SOUZA, 2007). Os valores extremos (*outliers*) foram tratados pelo teste de resíduos padronizados *Jackknife* o qual teve aplicação consecutiva até que novos valores extremos não fossem detectados ou até exclusão máxima de 22,2% do número de análises (HORWITZ, 1995). O MMQO parte da premissa que os resíduos seguem a distribuição normal, independência (não autocorrelação dos resíduos) e homogeneidade das variâncias dos resíduos, além da análise de variância da regressão e desvio da linearidade de resíduos.

A normalidade foi avaliada por Ryan e Joiner (1976) onde a hipótese nula ( $H_0$ ) é de que os resíduos da regressão seguem a distribuição normal e a hipótese alternativa é que os resíduos não seguem a distribuição normal. A estatística deste teste é o coeficiente de correlação do gráfico de probabilidade normal ou coeficiente de correlação de Ryan-Joiner  $Req$ . A hipótese nula ( $H_0$ ) é rejeitada quando o coeficiente de correlação de Ryan-Joiner ( $Req$ ) for menor que o coeficiente de correlação crítico  $Rcrit$  (nível de significância  $\alpha = 0,05$ ) estabelecido (SOUZA, 2007).

A homoscedasticidade das variâncias dos resíduos foi avaliada por Levene (1960) modificado por Brown e Forsythe (1974). A hipótese nula ( $H_0$ ) testada é de que as variâncias dos resíduos não diferem entre si, portanto são homoscedásticas, contra a hipótese alternativa de que as variâncias dos resíduos diferem entre si, logo são heteroscedásticas. A hipótese nula ( $H_0$ ) é rejeitada quando a estatística calculada  $t_L$  for maior que o valor  $t_{crít}$  (nível de significância  $\alpha = 0,05$ ). Há indicação de homoscedasticidade caso a estatística calculada ( $t_L$ ) não exceda o valor crítico (LEVENE, 1960; BROWN; FORSYTHE, 1974).

Para verificar a independência dos resíduos da regressão foi usado o teste de Durbin-Watson (1951) com nível de significância  $\alpha = 0,05$ . Considera-se como hipótese nula ( $H_0$ ) de que não haja autocorrelação entre os resíduos, ou seja, são independentes; e a hipótese alternativa de que haja autocorrelação entre os resíduos e, portanto, não são independentes. O valor da estatística de Durbin-Watson varia de zero a quatro com média de dois, portanto se o valor calculado  $d$  converge para dois, significa que não há autocorrelação, logo, os resíduos são independentes. Porém, se o valor calculado  $d$  se afasta de dois para zero ou quatro, a autocorrelação aumenta e valores de Durbin-Watson (valor calculado  $d$ ) iguais a zero indicam perfeita autocorrelação positiva, enquanto valores iguais a quatro indicam perfeita autocorrelação negativa. O valor calculado para a estatística  $d$  do teste, maior que o limite superior, indica a independência dos resíduos.

A fim de realizar o teste da significância da regressão e do desvio da linearidade, a variabilidade total das respostas foi decomposta na soma de quadrados dos resíduos da regressão (em torno da regressão) e soma dos quadrados devida à regressão. A estatística do teste é a razão entre as variâncias, que segue a distribuição de  $F$  com graus de liberdade correspondentes. A avaliação da significância da regressão foi testada baseada na hipótese nula ( $H_0$ ) de que a regressão linear não é significativa ( $p$  – valor  $< 0,001$  - para um nível de confiança de 99,9%) contra a hipótese alternativa de que a regressão linear é significativa. A hipótese nula ( $H_0$ ) é rejeitada quando a estatística  $F$  estimada for maior que o valor de  $F_{crítico}$  (nível de significância  $\alpha = 0,05$ ).

Para avaliar a significância do desvio da linearidade, a hipótese nula ( $H_0$ ) testada é de que o modelo linear simples é correto (não há desvio da linearidade) enquanto a hipótese alternativa é de que o modelo linear não é correto (há desvio da linearidade). A hipótese nula ( $H_0$ ) é rejeitada quando a estatística  $F$  estimada for maior que o valor de  $F_{crítico}$  (nível de significância  $\alpha = 0,05$ ).

### 3.6.3 Faixa de trabalho

O limite de restrição do bisfenol A no Brasil está relacionado apenas com o LME estabelecido em 0,6 mg/kg (600 ng/kg) de alimento. Entretanto, o bisfenol A tem sido detectado em níveis traços em diferentes alimentos. Dessa forma, a faixa de trabalho nesse estudo foi estabelecida a partir dos estudos de linearidade.

### 3.6.4 Efeito matriz

Para a avaliação da influência da matriz na resposta do bisfenol A foi utilizado leite em pó integral. A fim de verificar a influência da matriz nesse estudo foram preparadas curvas analíticas na matriz estudada, utilizando extrato final da solução matriz filtrado em MeOH/H<sub>2</sub>O (80:20, v/v, 0,1 % hidróxido de amônio) de uma amostra branco de leite em pó integral, e outra utilizando uma solução MeOH/H<sub>2</sub>O (80:20, v/v, 0,1 % hidróxido de amônio). As curvas de calibração foram preparadas em cinco níveis de concentração variando de 0,5 a 2,5 ng/mL de bisfenol A e cada solução foi então analisada em triplicata.

Na avaliação do efeito de matriz, inicialmente as variâncias das curvas de calibração foram comparadas pelo teste  $F$  (SNEDECOR; COCHRAN, 1989) para comparar as variâncias entre os dois grupos. As variâncias dos dois grupos podem ser combinadas e as médias comparadas pelo teste de  $t$  para avaliação das inclinações das curvas. A homoscedasticidade entre as variâncias dos resíduos das duas curvas foi calculada através do teste de  $F$ . A hipótese nula ( $H_0$ ) de que as variâncias dos resíduos das duas curvas (solvente e matriz) não diferem entre si foi testada com a hipótese alternativa de que as variâncias dos resíduos são diferentes. A hipótese nula é rejeitada quando a estatística calculada  $t_L$  for maior que o  $t_{crítico}$ , portanto se a estatística calculada não exceder o valor crítico ( $t_{crítico}$ ) ( $p\text{-valor} < 0,05$ ) há indicação de homoscedasticidade, não há, portanto, razões para rejeitar a hipótese nula ( $H_0$ ) e acreditar que a variância dos resíduos não seja constante.

A comparação das interseções das duas curvas foi calculada através do teste  $t$  de variâncias. Testando a hipótese nula ( $H_0$ ) de que as inclinações e interseções não diferem entre si (não há efeito de matriz) com a hipótese alternativa de que as inclinações e interseções são diferentes (há efeito matriz) (SOUZA, 2007). A hipótese nula ( $H_0$ ) de que não há efeito matriz é rejeitada quando as probabilidades estatísticas  $t_a$  e  $t_b$  calculadas ( $p\text{-valor}$ ) são menores que a significância  $\alpha/2$ , para o nível de confiança estabelecido (nível de significância  $\alpha = 0,05$ ).

### 3.6.5 Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)

Neste estudo os limites de detecção e quantificação foram obtidos através da relação sinal/ruído e confirmados por meio das curvas analíticas finais. Para isso, foi usado o leite em pó integral reconstituído (1:10) fortificado com bisfenol A no nível de 0,5 ng/mL. O limite de detecção foi estimado através da equação (KAISER, 1968):

$$LOD = 3,3 \frac{s}{b} \quad (1.1)$$

Sendo:

$s$  = desvio padrão da resposta do branco

$b$  = inclinação (coeficiente angular) da curva analítica

Já o limite de quantificação foi estimado através da seguinte equação:

$$LOQ = 10 \frac{s}{b} \quad (1.2)$$

Sendo:

$s$  = desvio padrão da resposta do branco

$b$  = inclinação (coeficiente angular) da curva analítica

### 3.6.6 Tendência/Exatidão

Inicialmente foram analisadas algumas amostras de leite em pó preparadas para identificar uma amostra branco, ou seja, uma amostra sem níveis detectáveis de bisfenol A, uma vez identificada, a amostra branco foi utilizada para o experimento de recuperação.

Nesse estudo a recuperação foi calculada através da razão entre as áreas obtidas das amostras branco de leite em pó reconstituída (1:10) fortificadas (0,5 e 1,0 ng/mL de bisfenol A) e a referência, solução matriz fortificada nos mesmos níveis usados nas amostras branco fortificadas. A solução matriz foi obtida através de um *pool* de soluções branco tratadas conforme o método de preparo.

A fortificação em dois níveis de bisfenol A (0,5 e 1,0 ng/mL) da amostra branco ocorreu logo após a reconstituição do leite em pó (1:10), mantendo a sequência do tratamento das amostras como apresentada na Figura 11 da subseção 3.5. A referência foi obtida a partir

da adição de padrão de bisfenol A a uma alíquota da solução matriz considerando os respectivos níveis das amostras branco fortificadas.

### 3.6.7 Precisão

Ela é expressa em termos de desvio padrão das concentrações obtidas em análises genuínas ensaiadas em mesmas amostras. Para a realização dos estudos de repetibilidade do método proposto três amostras de leite em pó integral reconstituída (1:10) foram fortificadas no nível de concentração de 0,5 ng/mL de bisfenol A e analisada a partir de três repetições.

Em três dias diferentes, foram preparadas e analisadas, três repetições de uma mesma amostra para avaliar a precisão intermediária do método. Amostra branco de leite em pó integral reconstituído (1:10) fortificada no nível de 0,5 ng/mL de bisfenol A foi usada na avaliação. A precisão intermediária foi calculada pela equação (INMETRO, 2018):

$$Si_{(j,k)} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{k=1}^n (y_k - \bar{y})^2} \quad (1.3)$$

Sendo:

$Si_{(j,k)}$  = Desvio Padrão de Precisão Intermediária

$n$  = nº de ensaios efetuados por amostra ou padrão

$y_k$  = cada resultado obtido

$\bar{y}$  = representa a média aritmética de cada resultado obtido

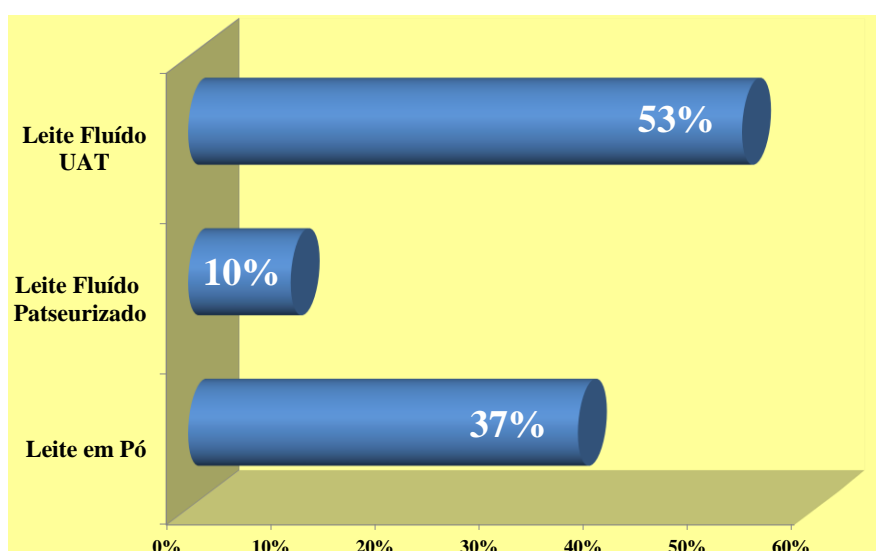
### 3.7 Amostras analisadas

Com relação ao teor de gordura foram analisadas apenas amostras integrais (3% de gordura). Primeiramente, essa escolha foi baseada no perfil da substância analisada. Como o bisfenol A é uma substância moderadamente lipofílica é de se esperar que a presença dela em alimentos com maior teor de gordura seja mais prevalente, uma vez que a substância acumulada no tecido adiposo das vacas poderia ser secretada juntamente com a gordura do leite. O segundo motivo para a escolha do leite integral foram os dados do estudo de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL), em 2016, que apontam um consumo de leite integral para 54,8% da população

brasileira, portanto um maior número de indivíduos estaria exposto à substância (BRASIL, 2017c).

Os níveis de bisfenol A foram avaliados em 51 amostras de leite fluido integral (UAT e pasteurizado) e leite em pó integral, provenientes de lotes de fabricação diferentes. As amostras foram obtidas no comércio varejista do município do Rio de Janeiro entre abril/2019 e julho/2019, sendo 19 amostras de leite em pó e 27 de leite fluido UAT e 5 de leite pasteurizado (Gráfico 2). As 51 amostras foram de 27 diferentes marcas.

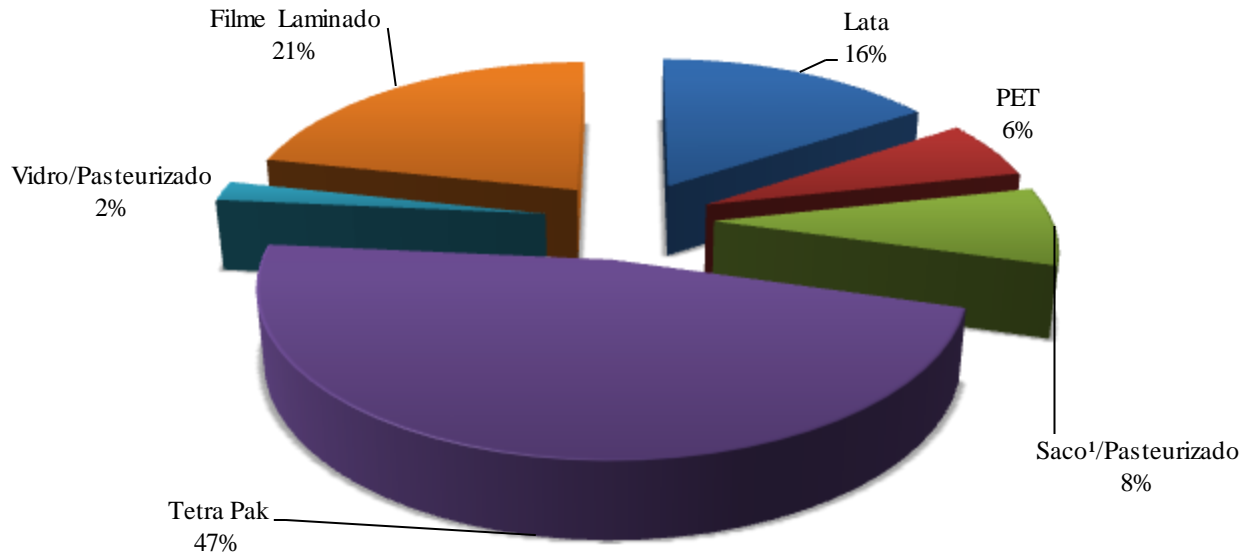
Gráfico 2 - Percentual dos diferentes tipos de leites analisados



Fonte: O autor, 2019.

Além da divisão entre leite fluido e leite em pó as amostras foram divididas em seis categorias: leite fluido integral em embalagens de: vidro, poli(tereftalato de etileno) (PET), polietileno (PE) e poli(cloreto de vinilideno) (PVDC) e cartonada Tetra Pak; leite em pó integral em embalagens de: lata metálica e poliéster metalizado-polietileno (filme laminado). O Gráfico 3 apresenta o percentual das categorias de embalagens das amostras de leite analisadas.

Gráfico 3 - Categoria das embalagens das amostras de leite analisadas



Fonte: O autor, 2019.

Legenda: <sup>1</sup> Embalagem de Polietileno (PE) e poli(cloreto de vinilideno) (PVDC).

As amostras foram armazenadas no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS, da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, e ensaiadas no Departamento de Química nos setores de contaminantes orgânicos e micotoxinas. As amostras permaneceram nas suas embalagens originais seguindo a recomendação do fabricante para armazenamento antes e após abertura. A relação das amostras analisadas está demonstrada no Apêndice 1.

### 3.8 Avaliação da exposição ao bisfenol A

A quantificação do bisfenol A livre é considerada adequada para uso no processo de avaliação de risco, visto que o bisfenol A conjugado (Bisfenol A-sulfato ou Bisfenol A-glicurônico) não exerce atividade hormonal, e espera-se, portanto, que apenas o bisfenol A não conjugado interaja com o receptor de estrogênio e cause efeitos adversos à saúde (SNYDER *et al.*, 2000; MATTHEWS; TWOMEY; ZACHAREWSKI, 2001). Dessa forma, avaliar a concentração de bisfenol A não conjugado em alimentos é uma forma importante de se avaliar o nível de exposição dos indivíduos.

A avaliação da exposição de bisfenol A pelo consumo de leite foi realizada com base na abordagem utilizada pela EFSA, porém desconsiderando a contaminação pelas fontes não dietéticas (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2015).

A avaliação da exposição ao bisfenol A foi estimada para crianças com até 12 meses de vida considerando um consumo exclusivo de leite em pó/fluido na dieta e a concentração máxima encontrada nas amostras analisadas nesse estudo, considerando assim um cenário de maior risco.

Foi estimada a ingestão diária considerando crianças com idades de uma semana, um mês, seis meses e doze meses baseado em um consumo médio de leite diário de 590, 642, 560 e 452 mL, respectivamente. O volume médio de leite usado neste estudo foi baseado no Guia alimentar para crianças menores de 2 anos que calcula a quantidade em gramas de leite materno ingerido em 24 horas, por faixa etária (BRASIL, 2005). Os pesos médios considerados para meninos e meninas, respectivamente, foram de 3,3 e 3,2 kg para crianças de 1 semana; 4,5 e 4,2 kg para um mês; 7,9 e 7,3 kg para seis meses e 9,6 e 8,9 kg para doze meses (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2006). Foi adotado para o cálculo da exposição a concentração de bisfenol A (0,53 ng/mL) em leite em pó integral reconstituído (1:10).



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

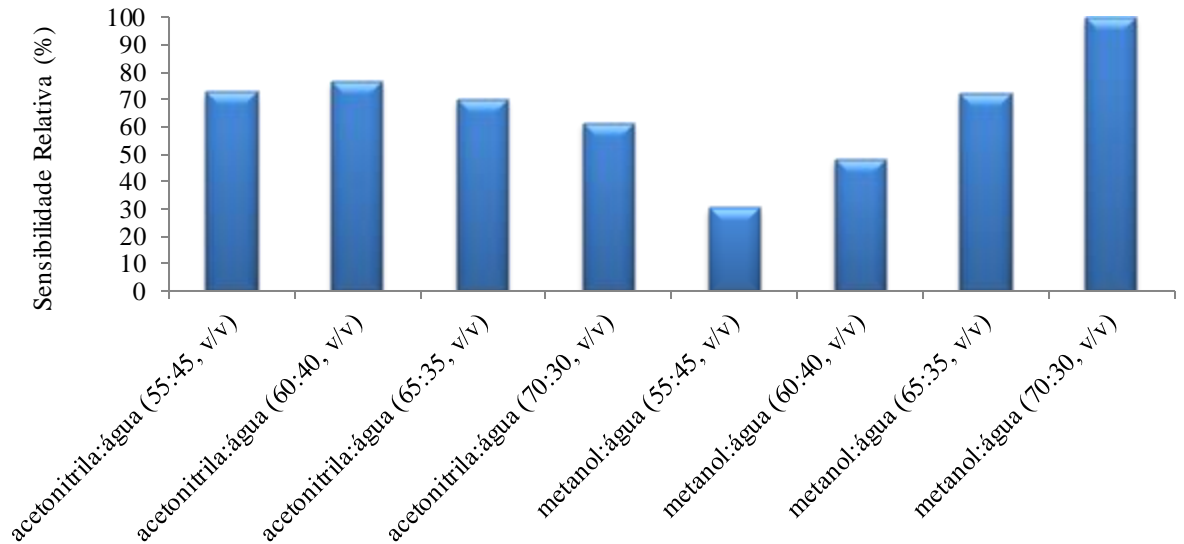
### 4.1 Desenvolvimento do método analítico

A voltagem de 2 kV apresentou a melhor resposta para a substância. As temperaturas superiores a 400°C não ofereceram ganho de sinal e, portanto, essa temperatura foi selecionada e temperatura de fonte de 150°C. O fluxo do gás de dessolvatação (N<sub>2</sub>) de 750 L/h foi selecionado já que fluxos superiores não ofereceram ganho de sinal para as substâncias. O fluxo foi mantido em 150 L/h já que essa foi a melhor condição de sensibilidade para as substâncias. As energias de colisão de 15 e 20 V foram usadas para as transições de quantificação -  $Q$  ( $m/z$  227>212) e de qualificação -  $q$  ( $m/z$  227>133), respectivamente. As transições foram monitoradas no modo *ESI* (-) através do modo de aquisição por monitoramento de reações múltiplas – *MRM* (*Multiple Reaction Monitoring*) da solução padrão de bisfenol A na concentração de 0,5 ng/mL.

Como o bisfenol A está presente em concentração traço e o leite é uma matriz complexa foram analisadas composições da fase móvel que se adequassem a detecção em modo de ionização negativo por *electrospray*.

O Gráfico 4 apresenta as sensibilidades relativas (%) referentes as diferentes fases móveis e as suas respectivas proporções avaliadas no nível de 50 ng/mL de bisfenol A em matriz.

Gráfico 4 – Avaliação dos diferentes sistemas de fase móvel testadas no ensaio preliminar das condições de análise, no nível de 50 ng/mL de bisfenol A em matriz. Condições de análise: sistema de eluição isocrático; fluxo de 0,3 mL/min; temperatura do forno da coluna 35°C; volume de injeção de 5 µL



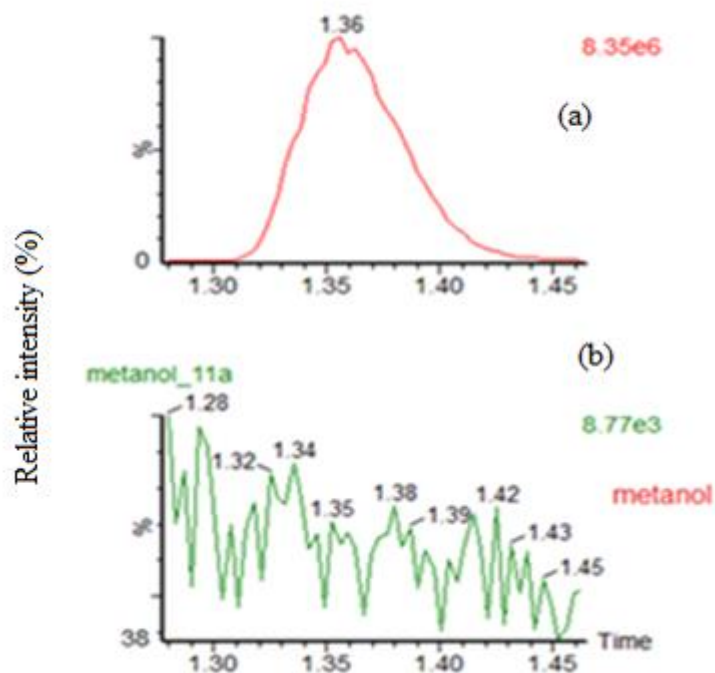
Fonte: O autor, 2019.

A escolha da fase móvel fundamentou-se na comparação entre as médias da altura dos picos cromatográficos de bisfenol A obtidos. Dessa forma, o sistema MeOH/H<sub>2</sub>O (70:30) foi escolhido como eluente mais adequado para as análises, usando um fluxo de 0,3 mL/min. Modificação de fluxo de 0,3 mL/min para 0,35 mL/min foi acompanhado de perda na sensibilidade em 21,2%.

Ao se avaliar o efeito da adição de 0,1% de hidróxido de amônio na fase móvel MeOH/H<sub>2</sub>O (60:40), foi observada perda na sensibilidade, sendo esta de 61%.

Não foi observado efeito de memória (*carryover*) com injeção de solvente após solução padrão 5 ng/mL de bisfenol A para o método proposto como apresentado na Figura 12.

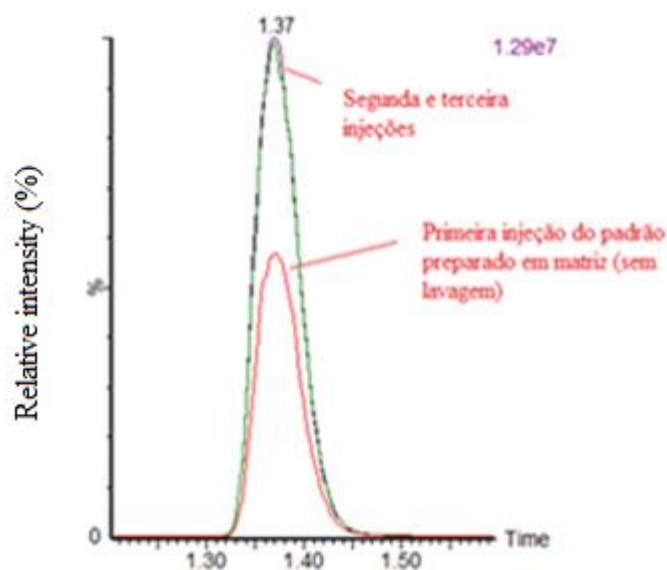
Figura 12 – Cromatograma da ausência de efeito memória (*carryover*). (a) Cromatograma de solução padrão 5 ng/mL de bisfenol A em matriz. (b) Cromatograma da injeção de metanol imediatamente após a análise da solução de bisfenol A a 5 ng/mL.



Fonte: O autor, 2019.

A injeção de padrão de 5 ng/mL em triplicata (mesma solução) mostrou inicialmente um aumento do sinal na segunda injeção após a primeira, o que não houve entre a segunda e terceira que ficaram iguais. Neste momento, foi aplicado o tempo de corrida mais curto possível sendo o fim da corrida logo após a saída do pico de interesse. Esse efeito (Figura 13) foi relacionado à ausência da lavagem da coluna cromatográfica no final da corrida.

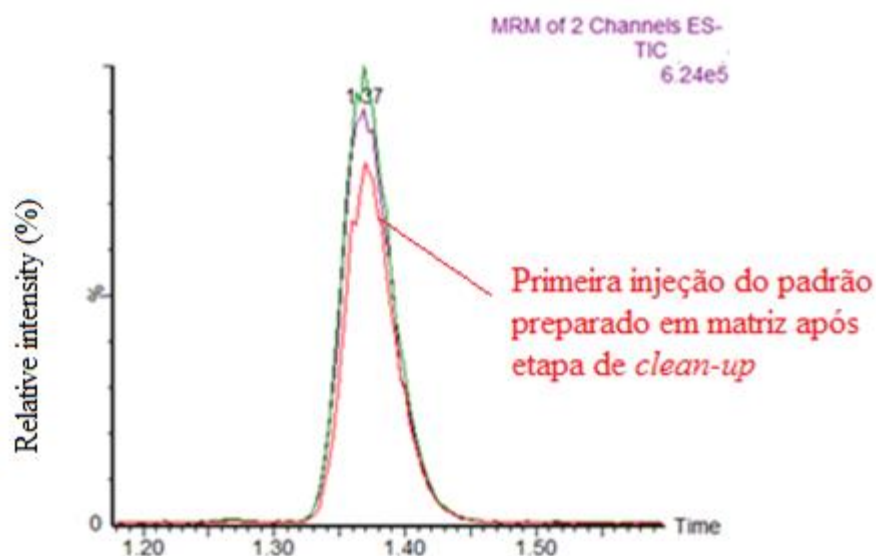
Figura 13 - Cromatograma do efeito da ausência de limpeza do sistema cromatográfico no final da corrida, no nível de 5 ng/mL de bisfenol A em matriz



Fonte: O autor, 2019.

Foi observada uma redução no efeito de aumento de sinal após a primeira injeção com uso de PSA e C<sub>18</sub>, mas não resolveu o problema de repetibilidade como pode ser visualizado na Figura 14. Por este motivo, a etapa de *clean-up* foi descartada no procedimento de tratamento de amostra.

Figura 14 - Cromatograma demonstra a resposta da etapa de clean-up do extrato com 50 mg de C<sub>18</sub> e 50 mg de PSA, mantidas as mesmas condições cromatográficas, em nível de 50 ng/mL de bisfenol A



Fonte: O autor, 2019.

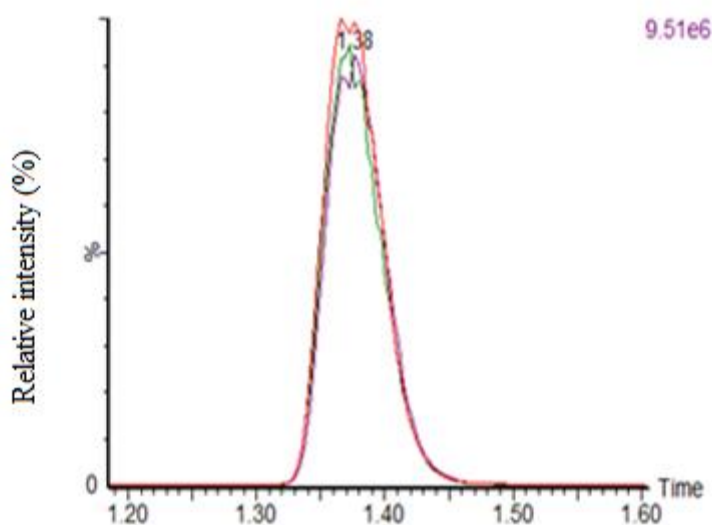
Para os diferentes tempos de lavagem e solventes descritos abaixo tivemos os seguintes resultados:

a) MeOH/H<sub>2</sub>O (70:30) – tempo variou de 1,5 minutos a 5,0 minutos, mas não se observou redução do efeito;

b) Com o uso de solvente de limpeza para 100% de MeOH, após corrida por 5,0 minutos, seguida da condição inicial MeOH/H<sub>2</sub>O (70:30) por 7,0 minutos, havendo uma diminuição do efeito, mas sem resolver completamente o problema.

c) Utilização de solvente de lavagem ACN:MeOH:isopropanol:H<sub>2</sub>O (1:1:1:1, v/v/v/v), no final da corrida por 5,0 minutos e, estabilização na condição inicial por 5,0 minutos. Este procedimento foi suficiente para resolver o problema como demonstrado na Figura 15.

Figura 15 - Injeção em triplicata de padrão de 5 ng/mL de bisfenol A (em matriz) aplicando a limpeza do sistema cromatográfico no final da corrida com solvente ACN:MeOH:isopropanol:H<sub>2</sub>O (1:1:1:1, v/v/v/v)



Fonte: O autor, 2019.

O volume de injeção de 5 µL apresentou a maior sensibilidade (relação sinal/ruído) e a melhor simetria do pico cromatográfico, e foi selecionado como volume de injeção padrão para todas as análises.

## 4.2 Otimização das condições de tratamento da amostra

O método descrito por Przybylski e Segard (2009) utilizou a extração com hexano e ácido acético 1% em ACN, secagem do extrato com sulfato de magnésio e acetato de sódio, centrifugação, remoção da camada de hexano seguida de nova centrifugação. Em sequência, 1 mL do sobrenadante extraído é tratado com PSA (etapa de *clean-up*) e 200 µL da camada sobrenadante é levado à secura e ressuspensão em 20 µL com 0,1% de ácido acético em ACN sem etapa de filtração. Já no método descrito por Sartori *et al.* (2015) são usados hexano e ácido acético 1% em ACN para extração, adição ao extrato o sulfato de magnésio e cloreto de sódio, centrifugação, remoção da camada de hexano, evaporação de 5 mL da fase de ACN até secura (sob aquecimento - 50°C), ressuspensão com 1 mL de solvente MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) e filtração.

Para a extração das amostras neste estudo o método QuEChERS apresentou algumas alterações em relação aos autores mencionados. Durante a etapa de extração o hexano e ACN foram mantidos, porém sem adição de ácido acético na ACN. Em relação a etapa de adição de sulfato de magnésio e o cloreto de sódio também foram usados seguida de centrifugação. Entretanto, a quantidade usada dos sais foi ¼ da usada por Sartori *et al.* (2015). Não foi realizada a etapa de *clean-up* e a evaporação foi realizada em temperatura ambiente. Nesta última etapa 1 mL da fase do extrato em ACN foi levado à secura, ressuspensão em 1 mL de solvente MeOH/H<sub>2</sub>O (80:20, v/v) com 0,1% de hidróxido de amônio e filtrado.

O método apresentou recuperação média de 93,8% e DPR de 8,3% da análise de seis amostras de leite em pó fortificadas com bisfenol A em um nível de concentração de 50 ng/mL (leite reconstituído 1:10), sendo selecionado para validação.

A partir desses resultados foi possível verificar que a utilização de ACN foi eficiente na extração do bisfenol A nesse tipo de matriz, além disso, ela ainda apresenta a capacidade de precipitar proteínas, melhorando a etapa de limpeza. O hexano, solvente não polar, é usado junto com a ACN para extrair bisfenol A em amostras ricas em gorduras, assim como melhorar a etapa de limpeza.

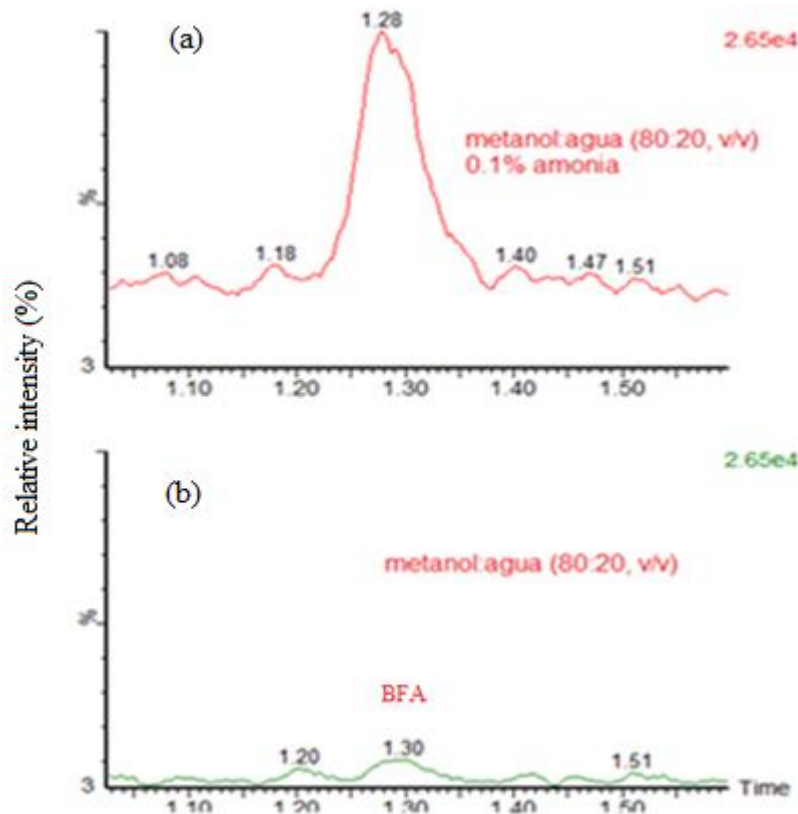
Em relação ao solvente utilizado para ressuspender os extratos foi utilizada uma mistura de ACN/H<sub>2</sub>O como solvente final para injeção e conseqüentemente como solvente de ressuspensão para a adaptação a mistura da fase móvel inicialmente utilizada (ACN/H<sub>2</sub>O) e conforme documentado na literatura (KHEDR, 2013; YI; KIM; YANG, 2010; ZIMMERS *et al.*, 2014). Mas houve uma mudança da composição da fase móvel para MeOH/H<sub>2</sub>O (70:30)

que melhorou a resposta cromatográfica de bisfenol A. Neste contexto foram testadas também diferentes misturas de solvente a base de MeOH/H<sub>2</sub>O para ressuspensão.

Baseado na comparação das alturas dos picos cromatográficos de bisfenol A obtidos a partir de solução padrão de 5 ng/mL ressuspensionado nas seguintes composições de MeOH/H<sub>2</sub>O: 50:50; 70:30; 75:25; 80:20; 90:10; 100:0 v/v, a mistura MeOH/H<sub>2</sub>O (80:20, v/v) apresentou a melhor resposta de todas.

Apesar da melhora no aumento da resposta cromatográfica usando solvente MeOH:H<sub>2</sub>O (80:20, v/v) foram analisadas a influência da adição de ácido fórmico 0,1% e hidróxido de amônio 0,1% no solvente de ressuspensão. A adição de ácido fórmico 0,1% suprimiu a resposta, porém o hidróxido de amônio 0,1% aumentou a resposta como apresentado na Figura 16.

Figura 16 - Cromatogramas demonstram a influência da adição de hidróxido de amônio 0,1% no solvente final utilizado na ressuspensão, no nível de 1 ng/mL de bisfenol A em matriz. (a) Cromatograma de 1 ng/mL de bisfenol A em matriz com adição de hidróxido de amônio 0,1% no solvente final utilizado na ressuspensão e (b) Cromatograma de 1 ng/mL de bisfenol A em matriz sem adição de hidróxido de amônio 0,1% no solvente final utilizado na ressuspensão

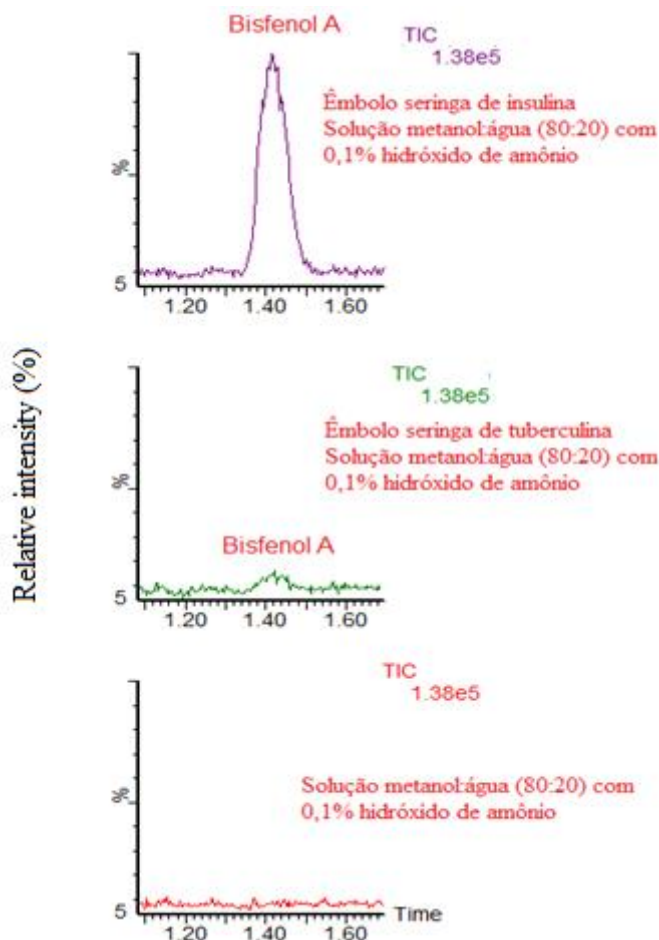


A análise de contaminantes nos insumos apresentou resíduos de bisfenol A somente no hexano, sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4$ ) e cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ).

Os sais usados no método QuEChERS ( $\text{MgSO}_4$  e  $\text{NaCl}$ ) passaram a ser muflados durante a noite a temperatura de  $400^\circ\text{C}$  antes de serem usados e mantidos acondicionados em frascos de vidro fechados. O hexano foi filtrado em sistema de filtração a vácuo usando membrana ( $\text{ENVI}^{\text{TM}}$ - 18 DSK 47mm – Sigma-Aldrich). Após esses procedimentos não foram observados problemas de contaminação nos brancos de método.

A análise de dois tipos de seringas de plástico (seringa tuberculina e insulina) mostrou a presença de bisfenol A que não foi possível eliminar com o tratamento de limpeza descrito anteriormente. A contaminação por bisfenol A foi detectada especificamente nos êmbolos das duas seringas (Figura 17). A análise dos corpos cilíndricos de ambas não mostrou contaminação por bisfenol A. Trata-se provavelmente de uso de bisfenol A como plastificante na matriz polimérica do embolo das seringas. Por esse motivo as seringas descartáveis não foram usadas durante as análises, sendo substituídas pelas seringas de vidro.

Figura 17 - Cromatogramas da migração de bisfenol A dos êmbolos de seringas descartáveis.



Fonte: O autor, 2019.



Após a eliminação destas contaminações, a manutenção da ausência de contaminação por bisfenol A foi confirmada continuamente através da análise do branco de método (sem amostra) em cada sequência.

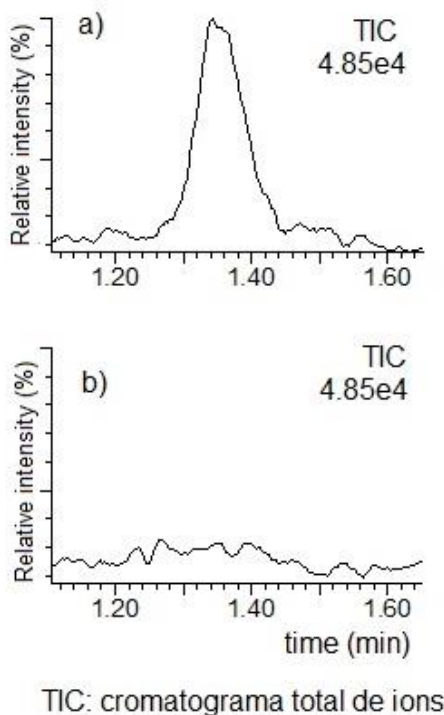
### **4.3 Validação do método analítico**

Nesse estudo foi validado o método analítico para a determinação de bisfenol A livre. Os parâmetros de desempenho dos métodos estudados foram: seletividade, linearidade, faixa de trabalho, efeito matriz, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), tendência/exatidão e precisão (repetibilidade e precisão intermediária).

#### **4.3.1 Seletividade**

No caso do bisfenol A o tempo de retenção foi de  $1,350 \pm 0,005$  minutos. A seletividade do método fica claramente evidenciada a partir da Figura 18 mostrando a ausência de substâncias interferentes no tempo de retenção do bisfenol A.

Figura 18 - Cromatogramas demonstrando ausência de interferentes no tempo de retenção do bisfenol A ( $t_R$  1,35 minutos). a) amostra de leite em pó integral reconstituída (1:10) fortificada com bisfenol A (0,5 ng/mL) e b) amostra de leite em pó integral reconstituída (1:10) não fortificada



Fonte: O autor, 2019.

#### 4.3.2 Efeito matriz

As curvas em matriz e solvente foram construídas em quatro níveis de concentração (0,5 a 2,0 ng/mL de bisfenol A). Essa faixa foi usada, pois o último nível (2,5 ng/mL de bisfenol A) apresentou efeito matriz. Cada nível foi analisado em triplicata.

Ao se aplicar a estatística  $F$ , foi verificada a heteroscedasticidade entre as variâncias dos resíduos das duas curvas, logo  $F_{\text{calculado}} > F_{\text{crítico}}$ , com um nível de confiança de 95% como pode ser observado na Tabela 4. Dessa forma, as curvas foram comparadas através de teste  $t$  de variâncias distintas (variâncias amostrais não homogêneas).

Tabela 5 - Avaliação da homoscedasticidade entre as variâncias dos resíduos das duas curvas

<b>Teste F</b>	<b>Bisfenol A</b>
$S^2_{res. Solvente}$	$2,26 \times 10^4$
$S^2_{res. Matriz}$	$8,54 \times 10^4$
$n_{Solvente}$	12
$n_{Matriz}$	12
$F_{calculado}$	3,78
$p\text{-valor}$	2,98

Fonte: O autor, 2019.

Legenda:  $S^2_{res}$ , variância dos resíduos da curva;  $n$ , número de pontos da curva analítica;  $p\text{-valor}$ , probabilidade da estatística calculada.

Através do teste  $t$  de variâncias distintas as inclinações e interseções das duas curvas foram comparadas e os resultados das estatísticas  $t_b$  e  $t_a$  para as curvas analíticas do bisfenol A estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 6 - Comparação das inclinações e interseções das curvas

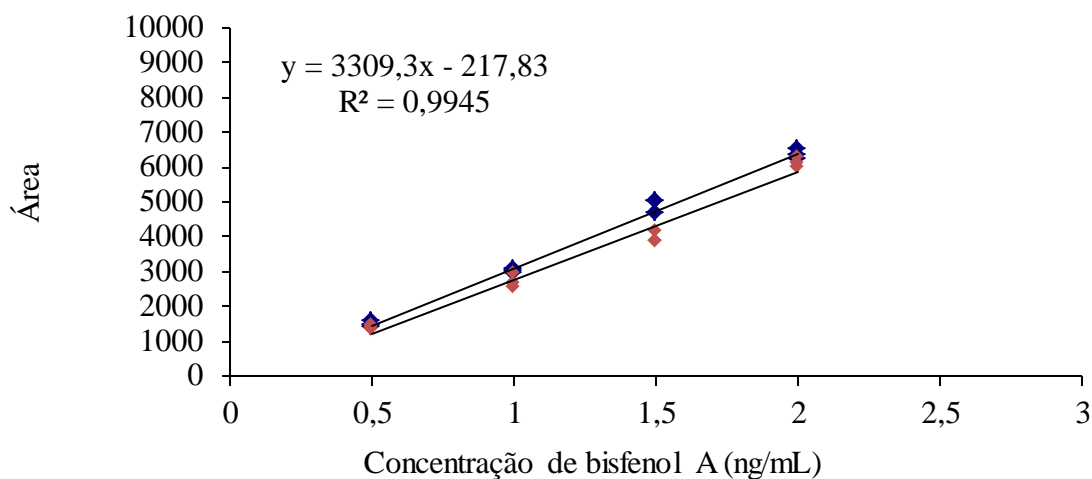
<b>Teste t</b>	<b>Bisfenol A</b>
$t_b$	1,27
$t_a$	0,49
$GL$	14
$p\text{-valor} (t_b)$	0,223
$p\text{-valor} (t_a)$	0,629

Fonte: O autor, 2019.

Legenda:  $t_b$ , valor de  $t$  calculado para a inclinação;  $t_a$ , valor de  $t$  calculado para a interseção;  $GL$ , graus de liberdade;  $p\text{-valor}$ , probabilidade da estatística calculada.

Os resultados dos testes permitem afirmar que o método não apresenta efeito matriz, pois as curvas analíticas preparadas no solvente e na matriz se equivalem, com um nível de confiança de 95%, portanto as curvas de calibração podem ser construídas em solvente para a quantificação das amostras na rotina. O Gráfico 5 apresenta a comparação entre as curvas analíticas preparadas na presença do solvente e da matriz para o bisfenol A.

Gráfico 5 - Gráficos comparativos entre as curvas analíticas preparadas na presença do solvente (azul) e da matriz (vermelha) para bisfenol A



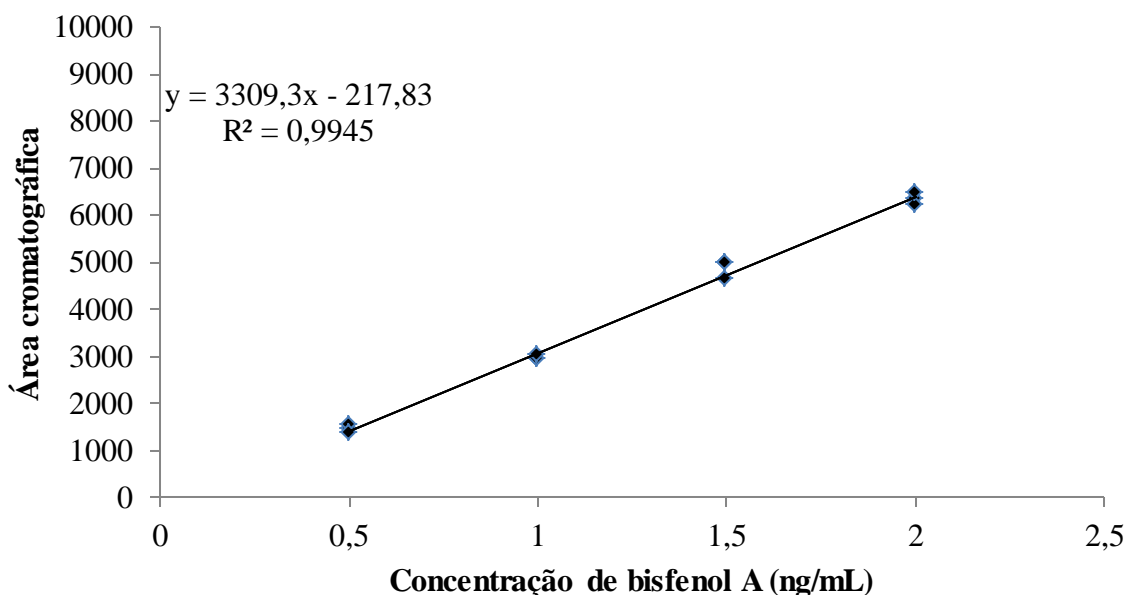
Fonte: O autor, 2019.

#### 4.3.3 Linearidade

As curvas em solvente foram construídas em quatro níveis de concentração (0,5 a 2,0 ng/mL de bisfenol A). Essa faixa foi usada, pois não apresentou efeito matriz. Cada nível foi analisado em triplicata.

Os valores extremos foram avaliados pelo método de resíduos padronizados *Jackknife*, cuja estatística é o resíduo padronizado *Jackknife* ( $J_{ei}$ ), calculado para cada ponto da curva analítica. Na curva analítica do bisfenol A, preparada em solvente, nenhuma repetição foi removida do conjunto de dados. O Gráfico 6 apresenta a curva analítica do bisfenol A em solvente.

Gráfico 6 - Curva analítica final de bisfenol A em solvente



Fonte: O autor, 2019.

A normalidade foi verificada através do teste Ryan-Joiner (RYAN; JOINER, 1976). A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos. O valor de  $R_{eq}$  encontrado, maior que o valor crítico  $R_{crit}$  ( $\alpha = 0,05$ ) indica que os resíduos da regressão seguem a distribuição normal.

Tabela 7 - Normalidade dos resíduos da regressão (teste de Ryan-Joiner)

	<b>Bisfenol A</b>
$R_{eq}$	0,97
$R_{crit} (\alpha = 0,05)$	0,93

Fonte: O autor, 2019.

Legenda:  $R_{eq}$ , coeficiente de correlação entre  $e_i$  e  $q_i$ ;  $R_{crit}$ , R crítico.

A fim de verificar a homoscedasticidade dos resíduos da regressão foi usado o teste de Levene (LEVENE, 1960) modificado por Brown e Forsythe (1974). Após o teste de Levene (1960), modificado por Brown e Forsythe (1974) foi verificada a homoscedasticidade dos resíduos da regressão visto que o valor encontrado para a estatística  $t_L$ , menor que o valor crítico indica a homoscedasticidade dos resíduos, com um nível de confiança de 95% como observado nos resultados apresentados na Tabela 7.

Com isso, pode-se concluir que as curvas de calibração em solvente avaliadas apresentaram segmentos lineares.

Tabela 8 - Homoscedasticidade dos resíduos da regressão (teste de Levene)

Estatística	Bisfenol A	
	Grupo 1	Grupo 2
$n$	6	6
Mediana	$-5,41 \times 10^1$	$1,63 \times 10^1$
$dm$	$6,97 \times 10^1$	$1,49 \times 10^2$
$SQD$	$4,64 \times 10^4$	$1,64 \times 10^5$
$s_p^2$	$2,10 \times 10^4$	
$t_L$	-0,95	
$t_{crítico}$	2,23	

Fonte: O autor, 2019.

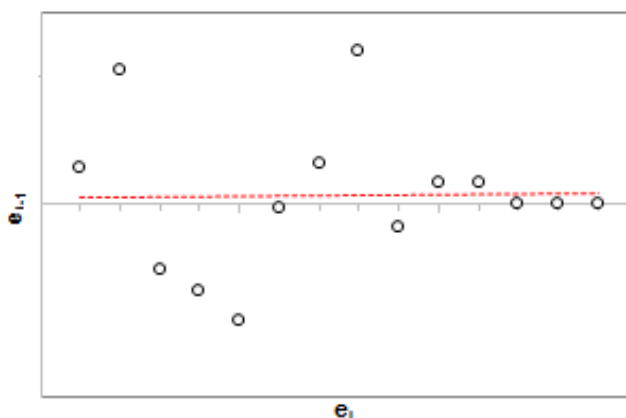
Legenda:  $n$ , número de observações no grupo;  $dm$ , média das diferenças entre cada resíduo e a mediana do seu grupo;  $SQD$ , soma dos quadrados dos desvios;  $s_p^2$ , variância combinada;  $t_L$ , estatística  $t$  calculada;  $t_{crítico}$ , estatística  $t$  tabelado.

Para verificar a independência dos resíduos da regressão foi usado o teste de Durbin-Watson com nível de significância  $\alpha = 0,05$ . A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos para os limites  $d_L$  e  $d_U$  com um nível de significância de 0,05 e o Gráfico 7 de Durbin-Watson mostrando a independência dos resíduos da regressão para a curva analítica do bisfenol A em solvente.

Tabela 9 - Independência dos resíduos da regressão (teste de Durbin-Watson)

Bisfenol A	
$d$ (calculado)	1,49
$d_L$ (Limite Inferior)	0,97
$d_U$ (Limite Superior)	1,33

Fonte: O autor, 2019.

Gráfico 7 - Gráfico de Durbin-Watson ( $e_i$  x  $e_{i-1}$ ), curva de bisfenol A em solvente

Fonte: O autor, 2019.

A fim de realizar o teste da significância da regressão e do desvio da linearidade, a estatística do teste é a razão entre as variâncias, que segue a distribuição de  $F$  com graus de liberdade correspondentes. A avaliação da significância da regressão foi testada para um  $p$  –  $valor < 0,001$  (nível de confiança de 99,9%). A hipótese nula ( $H_0$ ) é rejeitada quando a estatística  $F$  estimada for maior que o valor de  $F_{crítico}$  (nível de significância  $\alpha = 0,05$ ). Para avaliar a significância do desvio da linearidade a estatística  $F$  estimada deve ser maior que o valor de  $F_{crítico}$  (nível de significância  $\alpha = 0,05$ ).

Através da análise de variância (ANOVA) o teste de significância da regressão e do desvio da linearidade foi calculado e os resultados obtidos para as curvas analíticas do bisfenol A em solvente estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 10 - Análise de variância para significância da regressão e do desvio da linearidade do bisfenol A em solvente

Fonte de variação	GL	SQ	MQ	F	$p$ -valor
Regressão	1	$4,11 \times 10^7$	$4,11 \times 10^7$	$1,82 \times 10^3$	$1,20 \times 10^{-12}$
Resíduos	10	$2,26 \times 10^5$	$2,26 \times 10^3$		
Desvio da Linearidade	4	$1,02 \times 10^5$	$2,54 \times 10^3$	$1,23 \times 10$	$3,91 \times 10^{-1}$
Erro puro	6	$1,24 \times 10^5$	$2,07 \times 10^3$		
Total	11	$4,13 \times 10^7$			

Fonte: O autor, 2019.

Legenda: SQ, soma dos quadrados; GL, graus de liberdade; QM, média dos quadrados; F, estatística da análise de variâncias;  $p$ -valor, probabilidade da estatística calculada.

O valor de  $p$  –  $valor$  observado para a regressão da curva de bisfenol A foi inferior a 0,001 indicando que a regressão é significativa, com um nível de confiança de 99,9%. O valor de  $p$  –  $valor$  observado para o desvio da linearidade da curva foi superior a 0,05 indicando que a falta de ajuste ao modelo linear não é significativa com um nível de confiança de 95%. A linearidade da curva preparada confirma a utilização da faixa de trabalho adotada, sendo esta de 0,5 ng/mL a 2,0 ng/mL de bisfenol A.

#### 4.3.4 Faixa de trabalho

A faixa de trabalho adotada de 0,5 ng/mL a 2,0 ng/mL de bisfenol A se encontra próximo dos valores observadas em estudo realizado pela EFSA em 2015, sobre os níveis de exposição a partir de diferentes fontes dietéticas.

#### 4.3.5 Limites de detecção e quantificação

Leite em pó integral reconstituído (1:10) foi fortificado com bisfenol A no nível de 0,5 ng/mL e usado para calcular os limites de detecção e quantificação. Os mesmos foram obtidos através da relação sinal/ruído e confirmadas por meio das curvas analíticas finais. A Tabela 10 apresenta os valores de LOQ e LOD calculados.

Tabela 11 - Limites de Detecção e de Quantificação calculados a partir de leite em pó integral reconstituído (1:10), no nível de 0,5 ng/mL de bisfenol A

Limite	Bisfenol A
Limite de Detecção, LOD (ng/mL)	0,124
Limite de Quantificação, LOQ (ng/mL)	0,365

Fonte: O autor, 2019.

Segundo o Inmetro (2018), em análises traços, é possível estabelecer o LOQ como a concentração do primeiro nível da curva analítica. O valor de LOD determinado para o bisfenol A, por meio de sua curva analítica, foi inferior ao primeiro nível de concentração e foi considerado adequado.

Ao analisar bisfenol A em leite humano utilizando o método QuEChERS, Tuzimski *et al.* (2019) encontraram 0,54 ng/mL e 1,35 ng/mL para os limites de detecção e quantificação, respectivamente. Grumetto *et al.* (2013) encontraram 2,5 ng/mL e 8,0 ng/mL para LOD e LOQ, respectivamente, quando analisaram diferentes marcas comerciais de leite fluido. Na análise de bisfenol A em outras matrizes, Cunha *et al.* (2012) obtiveram um limite de detecção de 0,2 ng/g em peixes enlatados.

#### 4.3.6 Tendência/Exatidão

Nesse estudo a tendência foi avaliada pela determinação da recuperação que foi calculada através da razão entre as áreas obtidas das amostras branco de leite em pó reconstituída (1:10) fortificadas e a referência, solução matriz fortificada com bisfenol A em dois níveis de concentração 0,5 ng/mL (n = 3) e 1,0 ng/mL (n = 4). Os resultados obtidos para o ensaio de recuperação foram de 70,8% e 93,6% para os níveis de 0,5 ng/mL e 1,0 ng/mL de bisfenol A, respectivamente. Esses valores obtidos em cada nível de concentração encontram-se dentro do limite estabelecido pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) em 2016 de  $\bar{R}$  (%) entre 40 a 120% para concentração do analito ( $\leq 1 \mu\text{g/kg}$ ). A Comissão das



Comunidades Europeias (2002) estabelece os valores de  $\bar{R}$  (%) entre 50 a 120% para as mesmas concentrações do analito. Portanto, a recuperação do ensaio atende aos requisitos citados.

Tuzinski *et al.* (2019) e Yan *et al.* (2009) obtiveram recuperação do método analítico de 83% e 92% na determinação de bisfenol A em leite humano e leite fluido, respectivamente.

#### 4.3.7 Precisão

A repetibilidade foi calculada através de amostra de leite em pó reconstituída (1:10) fortificada no nível de concentração de 0,5 ng/mL de bisfenol A e analisada a partir de três repetições. Os valores calculados para o desvio padrão relativo de repetibilidade ( $DPR_r$ ), o desvio padrão de repetibilidade previsto ( $DPRP_r$ ) e a razão de Horwitz ( $HorRat_r$ ) estão apresentados na Tabela 11. Valor de  $HorRat_r$  encontrado foi de 0,7304 a 0,996, ou seja, menor que dois, dessa forma o método apresenta repetibilidade (HORWITZ; ALBERT, 2006). Segundo a Association of Official Analytical Chemists (2016) é esperado um  $DPR_r$  inferior a 30% para concentração do analito abaixo de  $\leq 1 \mu\text{g}/\text{kg}$ . O  $DPR_r$  encontrado foi menor que 11% atendendo também aos requisitos da AOAC.

Tabela 12 - Avaliação da Repetibilidade do bisfenol A para leite em pó integral reconstituído (1:10) fortificado no nível de 0,5 ng/mL de bisfenol A

<b>Estatística</b>	<b>Bisfenol A</b>
$DPR_r$	10,956
$DPRP_r$	$< 1,2\text{ng}/\text{g}$ $DPRP_r \leq 11$ a 15%
$HorRat_r$	0,7304 a 0,996

Fonte: O autor, 2019.

Legenda:  $DPR_r$ , desvio padrão relativo (repetibilidade);  $DPRP_r$ , desvio padrão relativo previsto (repetibilidade);  $HorRat_r$ , razão de Horwitz (repetibilidade).

Em três dias diferentes foram preparadas amostras de leite em pó reconstituída (1:10) fortificada no nível de concentração de 0,5 ng/mL de bisfenol A ( $n = 3$ ). Por meio da concentração de cada repetição de cada dia foi determinado o desvio padrão de precisão intermediária relativo ao tempo ( $si_{tempo}$ ) e do desvio padrão relativo de precisão intermediária ( $DPR_{precint}$ ). O método apresenta precisão intermediária com um valor de  $HorRat_R$  inferior a 2.

A Tabela 12 apresenta os resultados obtidos para o  $DPR_{precint}$  do bisfenol A, indicando precisão intermediária adequada visto que o valor de  $HorRat_R$  foi inferior a 2.

Tabela 13 - Avaliação da Precisão Intermediária do bisfenol A para leite em pó integral reconstituído (1:10) fortificado no nível de 0,5 ng/mL de bisfenol A (n=3)

<b>Estatística</b>	<b>Bisfenol A</b>
$si(\text{tempo})$	0,0253
$DPR_{precint}$	4,772
$DPRP_R$ (%)	22%
$HorRat_R$	0,217

Fonte: O autor, 2019.

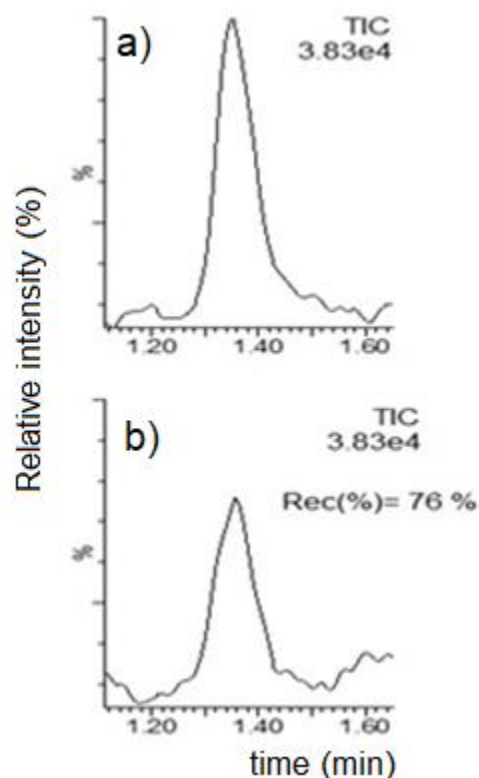
Legenda:  $DPR_{precint}$ , desvio padrão relativo (precisão intermediária);  $DPRP_R$ , desvio padrão relativo previsto (reprodutibilidade);  $HorRat_R$ , razão de Horwitz (reprodutibilidade).

#### 4.4 Controle de Qualidade Interno

Algumas medidas foram tomadas para garantir a validade dos resultados. A primeira envolvia a avaliação de amostras de leite em pó reconstituída (1:10) fortificadas na concentração de 0,5 ng/mL de bisfenol A que era avaliada ao longo das bateladas, assim era possível verificar a recuperação do método durante as análises.

A Figura 19 apresenta cromatograma da amostra de leite em pó reconstituída (1:10) fortificada com bisfenol A (0,5 ng/mL) avaliada durante uma batelada de amostras de leite analisada apresentando uma recuperação de 76%.

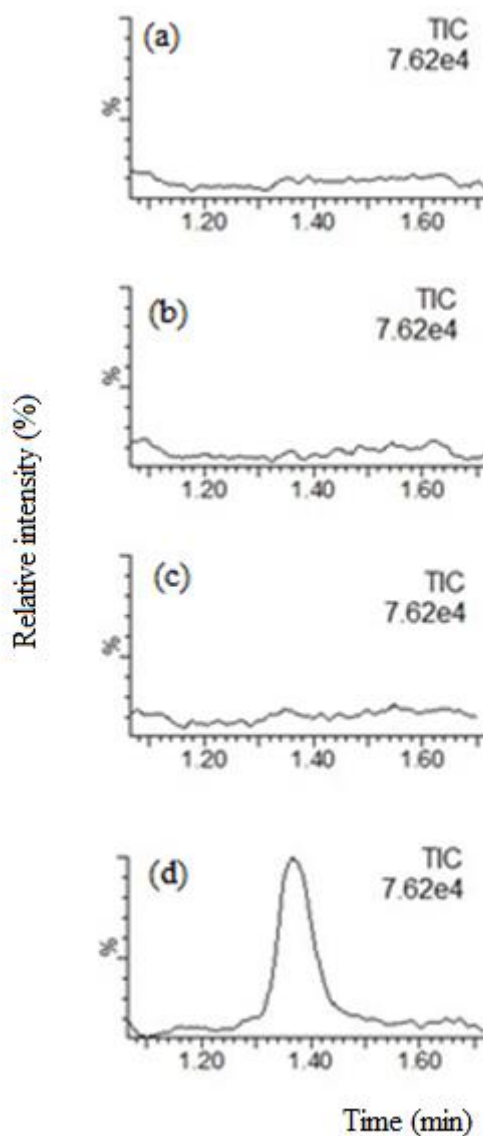
Figura 19 - Cromatograma demonstra a avaliação da recuperação do método ao longo das bateladas usando uma mostra de leite em pó integral reconstituída (1:10) fortificada com uma concentração de 0,5 ng/mL de bisfenol A (n = 3). a) Cromatograma de leite em pó integral reconstituído (1:10) fortificado com uma concentração de 0,5 ng/mL de bisfenol A (n = 3); b) Cromatograma de solução de bisfenol A na concentração de 0,5 ng/mL de bisfenol A (n = 3).



Fonte: O autor, 2019.

Também foi preparado um branco de reagente para verificar a ausência de interferentes nos reagentes/solventes usados na análise de rotina e possíveis contaminações com bisfenol A. Dessa forma, durante a análise de uma batelada de amostras, o branco de reagente também era analisado confirmando a ausência de interferentes. Em sequência era analisada amostra de leite em pó reconstituída (1:10) fortificada na concentração de 0,5 ng/mL de bisfenol A, confirmando a ausência de contaminação nos reagentes/solventes utilizados (Figura 20).

Figura 20 - Cromatogramas demonstrando ausência de contaminação nos reagentes/solventes utilizados nas análises de rotina. a, b, c) branco de método analisado nas bateladas das amostras comparado com d) amostra controle (0,5 ng/mL de bisfenol A)



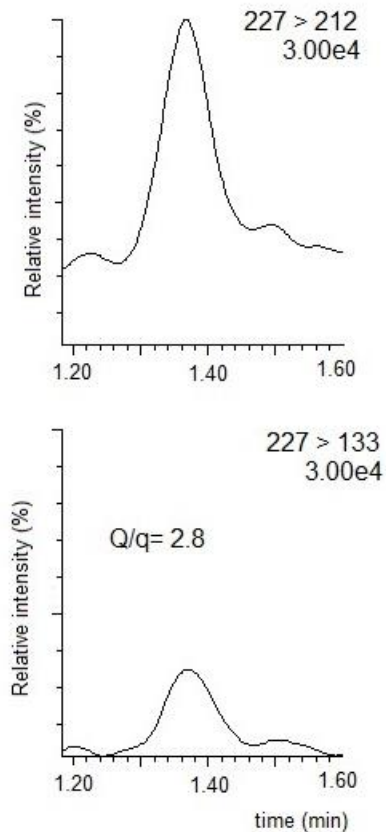
Fonte: O autor, 2019.

#### 4.5 Amostras analisadas

Do total de 51 amostras analisadas, somente duas amostras (3,9%) apresentaram níveis de Bisfenol A acima do limite de quantificação (0,365 ng/mL). As concentrações de bisfenol A encontradas foram 0,53 ng/mL e 0,50 ng/mL em leite em pó integral reconstituído (1:10) e em leite fluido integral, respectivamente. Do restante, 44 amostras ficaram abaixo do limite de

detecção do método (0,124 ng/mL) e cinco amostras (9,8%) acima do LD, mas abaixo do limite de quantificação.

Figura 21 - Cromatograma da amostra de leite em pó reconstituída (1:10) naturalmente contaminada por bisfenol A (0,53 ng/mL)



Fonte: O autor, 2019.

Dentre as dezenove amostras de leite em pó avaliadas neste estudo, em três amostras de leite em pó integral, sendo duas amostras acondicionadas em embalagens de filme laminado (Poliéster metalizado-polietileno) e uma amostra acondicionada em lata metálica o bisfenol A foi detectado. Uma amostra acondicionada em filme laminado apresentou concentração de bisfenol A de 0,53 ng/mL. Já nas trinta e duas amostras de leite fluido avaliadas, em duas amostras de leite fluido integral UAT, acondicionadas em embalagem PET - Poli(tereftalato de etileno) e embalagem cartonada Tetra Pak<sup>®</sup> o bisfenol A foi detectado. Uma amostra de leite fluido integral pasteurizado acondicionado em embalagem de polietileno (PE) e poli(cloreto de vinilideno) (PVDC) apresentou concentração de bisfenol A de 0,50 ng/mL.

Bomfim *et al.* (2015) avaliaram a contaminação de bisfenol A em fórmulas infantis comercializadas no Brasil e observaram concentrações da substâncias entre 0,2 a 10,2 µg/kg (0,2 a 10,2 ng/g) da amostra. Entretanto, não foram encontrados estudos avaliando a presença de bisfenol A em leite em pó integral e leite fluido integral (UAT e pasteurizado) no Brasil como no presente estudo.

Estudos em diversos países têm sido realizados para avaliar a contaminação de leite por bisfenol A e os níveis de bisfenol A têm sido relatados como muito variáveis. Kang e Kondo (2003), Sajiki *et al.* (2007) e Niu *et al.* (2015) não detectaram bisfenol A em leite. Já Liao e Kannan (2014) avaliando diferentes alimentos, dentre eles o leite, detectaram valor médio de 1,47 ng/g de bisfenol A em leite. Liu *et al.* (2008) também avaliando contaminação de bisfenol A em leite detectou níveis da substância na faixa de 1,6 a 2,6 ng/mL.

Já os níveis de bisfenol A encontrados nas amostras de leite em pó integral reconstituída (1:10) (0,53 ng/mL, ou 0,53 ng/g considerando a densidade igual a 1) e de leite fluido integral pasteurizado (0,50 ng/mL) foram próximos aos valores de 0,49 ng/g e 0,216 ng/g de bisfenol A encontrados por Shao *et al.* (2007) na China e Bemrah *et al.* (2014) na França, respectivamente.

A contaminação por bisfenol A tem sido observada em diferentes fontes dietéticas. Braunrath *et al.* (2005) avaliaram contaminação de bisfenol A em diferentes alimentos enlatados e encontraram concentrações da substância variando de 0,1 ng/mL a 38 ng/mL. Já Ackerman *et al.* (2010) encontraram níveis de bisfenol A variando entre 0,48 a 11 ng/g em fórmulas infantis. Gao *et al.* (2017) avaliaram diferentes tipos de chás e encontraram níveis de bisfenol A acima de 45,6 ng/g.

Em trabalho de Casajuana e Lacorte (2004) as amostras de leite UAT e esterilizado analisadas apresentaram valores médios de bisfenol A diferentes, sendo encontradas concentrações de bisfenol A entre 0,99 a 2,64 ng/mL para leite UAT e 1,17 a 1,29 ng/mL para leite esterilizado. No presente estudo o leite fluido integral pasteurizado apresentou contaminação por bisfenol A na concentração de 0,50 ng/mL.

O tempo de contato do leite com a embalagem durante o tratamento térmico pode ser um dos fatores para os diferentes níveis de bisfenol A no produto. No trabalho de Liu *et al.* (2008) também analisou leite fluido integral acondicionado em diferentes tipos de embalagens e encontraram valores de bisfenol A de 2,6 ng/mL e 1,6 ng/mL nas embalagens de polietileno e polietileno de alta densidade, respectivamente. No entanto, os autores relatam não terem detectado bisfenol A em amostras acondicionadas em Tetra Pak<sup>®</sup>. Isso pode ser atribuído a migração que aumenta em relação a temperatura e o tempo de exposição do produto à

embalagem, pois na esterilização o produto fica durante o período de 20 a 40 minutos exposto numa temperatura entre 110°C e 130°C e no tratamento UAT por um período de 2 a 4 segundos numa temperatura entre 130°C e 150°C.

Yoshida *et al.* (2001) avaliaram quatorze amostras de alimentos enlatados e encontraram níveis de bisfenol A variando entre porções sólidas e aquosas dos mesmos alimentos. Isto sugere que nas conservas o bisfenol A migrado inicialmente para a parte aquosa, migra para a sólida durante o armazenamento, conseqüentemente menos bisfenol A seria detectável na porção aquosa. Essa dinâmica pode ocorrer em amostras sólidas como o leite em pó. As frações mais próximas do contato da embalagem (resina epóxi) podem ter maiores valores de bisfenol A quando comparado com as porções do centro da lata. Assim como ocorre em embalagens metálicas, Hoekstra e Simoneau (2013) apontam para a migração do bisfenol A das embalagens plásticas para os alimentos quando elas são submetidas ao aquecimento.

A incidência de contaminação por bisfenol A tem sido frequentemente reportada em produtos lácteos, leite em pó ou fórmulas infantis acondicionadas em latas metálicas devido a migração da substância a partir da resina epóxi (ACKERMAN *et al.*, 2010; BILES; MCNEAL; BEGLEY, 1997; MARAGOU *et al.*, 2006). Maragou *et al.* (2006) avaliando a contaminação de bisfenol A em leite condensado acondicionado em lata metálica, revestida por resina epóxi, encontraram níveis quantificáveis de bisfenol A inferiores a 5,1 ng/g.

Vale destacar, que a contaminação do leite não ocorre apenas a partir da migração da substância via embalagem, uma vez que o bisfenol A pode entrar na cadeia de leite via múltiplos caminhos, como na alimentação animal, o ambiente da fazenda, os vários pontos durante a produção do leite (tubos usados durante o processamento do leite, transferência do leite para local de armazenagem, equipamentos usados para envase, dentre outros), além da duração dos processamentos tecnológicos usados na etapa final.

#### **4.6 Avaliação da exposição ao bisfenol A**

Os valores da ingestão diária estimada (ng/kg PC/dia) de bisfenol A são apresentados na Tabela 13.

Tabela 14 - Valores da ingestão diária estimada (ng/kg/PC/dia) para crianças até 12 meses de vida, considerando um cenário de uso exclusivo do leite em pó integral reconstituído contaminado naturalmente por bisfenol A (0,53 ng/mL)

Idade	Consumo de leite Diário <sup>1</sup> (mL)	Peso médio <sup>2</sup> (kg)		Ingestão diária estimada (ng/kg PC/dia)	
		Meninos	Meninas	Meninos	Meninas
1 semana	590	3,3	3,2	94,76	97,72
1 mês	642	4,5	4,2	75,61	81,01
6 meses	560	7,9	5,66	37,57	40,66
12 meses	452	9,6	8,9	24,95	26,92

Fonte: O autor, 2019.

Legenda: <sup>1</sup> valores obtidos de Brasil (2006); <sup>2</sup> valores obtidos de OMS (2006).

As faixas etárias apresentadas acima exigem maiores cuidados, em razão de esses grupos apresentarem uma dieta restrita e do baixo peso corpóreo, aliado a imaturidade fisiológica nessa faixa etária. Meninos com 1 semana de vida se alimentando apenas com o leite contaminado encontrado nesse estudo apresentaria uma ingestão diária estimada de 95 ng/kg PC/dia enquanto meninos de 6 meses de 38 ng/kg PC/dia. Em relação às meninas, aquelas com 1 semana de vida teriam uma ingestão diária estimada em 98 ng/kg PC/dia enquanto aquelas com 12 meses de 41 ng/kg PC/dia.

A Autoridade Europeia para Segurança estimou em 2015 uma ingestão diária entre 30 e 80 ng/kg PC/dia para bebês (0 a 6 meses) alimentados com fórmula infantil. Já estudo de Cirillo *et al.* (2015) considerando o pior cenário para bebês (0 a 4 meses) alimentados também com fórmula infantil estimou uma ingestão diária entre 0,99 a 1,27 µg/kg PC/dia (990 a 1270 ng/kg PC/dia). Portanto, os valores obtidos neste estudo estão próximos ao estimado pela EFSA e inferior ao estimado por Cirillo *et al.* (2015).

Estudos *in vivo* têm mostrado que os efeitos da exposição ao bisfenol A são mais notáveis no desenvolvimento fetal até o início da infância. Os principais efeitos estariam relacionados à alteração no desenvolvimento sexual secundário, nas alterações neurocomportamentais e nos distúrbios imunológicos. Isso é possível, pois o início da vida representa a maior janela de vulnerabilidade para perturbações fisiológicas e metabólicas com consequências a longo prazo e potencialmente duradouras (RUBIN *et al.*, 2001; ERLER, NOVAK, 2010; VAN ESTERIK *et al.*, 2014; LEGLER *et al.*, 2015)



A Autoridade Europeia e o Programa Nacional de Toxicologia do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos (*National Toxicology Program: U.S. Department of Health and Human Services - U.S.NTP*) salientam que valores de bisfenol A inferiores a ingestão diária tolerável não causariam efeitos adversos à saúde dos indivíduos. Considerando o pior cenário a estimativa de exposição obtida por faixa etária e sexo nesse estudo encontra-se abaixo da ingestão diária tolerável atual para o bisfenol A de 4000 ng/kg PC/dia (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2015). Esse resultado não difere de muitos outros estudos que estimaram a exposição do bisfenol A a partir de diferentes fontes dietéticas. Ainda assim, os estudos têm mostrado os possíveis danos à saúde dos indivíduos quando a exposição ao bisfenol A ocorre de forma crônica mesmo em níveis baixos. Eles têm apontado para a correlação positiva entre exposição ao bisfenol A e risco aumentado para o desenvolvimento de obesidade, aumento da resistência a insulina, diminuição da tolerância a glicose, aumento da gordura abdominal, aumento do tecido adiposo e risco aumentado para a síndrome metabólica (ALONSO-MAGDALENA *et al.*, 2010, HOWDESHELL *et al.*, 2008; WEI *et al.*, 2011; ANGLE *et al.*, 2013; AMIN *et al.*, 2018).

Diante de todas essas evidências científicas o Programa Nacional de Toxicologia dos Estados Unidos (*U.S NTP*) desenvolveu o programa *CLARITY-BPA (Consortium Linking Academic and Regulatory Insights on BPA Toxicity)* a fim de estudar a toxicidade do bisfenol A. A EFSA aguarda os resultados provenientes desse estudo americano para avaliar os novos limites de migração, IDA e NOAEL (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2018; NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM, 2019). Dessa forma, fica evidenciada a importância de se pesquisar as diferentes fontes dietéticas contaminadas por essa substância em diferentes partes do mundo.

O presente estudo é o primeiro a identificar a contaminação de leite em pó e fluido (UAT e pasteurizado) por bisfenol A no Brasil. As análises em leites integrais fluidos e em pó são de extrema importância visto o alto consumo deste produto no País, portanto o resultado encontrado demonstra a importância de se conduzir estudos que monitorem a contaminação deste alimento e de outras fontes dietéticas.

## 5 CONCLUSÃO

O método otimizado para detecção e quantificação do bisfenol A a partir de leite fluido integral (UAT e pasteurizado) e leite em pó integral foi considerado adequado ao propósito. Todos os parâmetros avaliados como linearidade, efeito matriz, seletividade, precisão e exatidão apresentaram resultados satisfatórios para as faixas de concentração definidas na validação do método.

A extração através do método QuEChERS modificado foi eficiente para a quantificação e detecção de bisfenol A. O método tem o benefício de ser relativamente rápido, pois não há necessidade de etapas adicionais de limpeza como a extração em fase sólida. O método apresentou sensibilidade adequada ao propósito do estudo e comparável a outros métodos reportados na literatura.

Com base no método validado foi possível analisar as amostras de leite fluido e em pó de diferentes marcas. Das 51 amostras analisadas, duas amostras (3,9%) apresentaram níveis de bisfenol A acima do limite de quantificações. Na amostra de leite em pó integral reconstituído (1:10) e em leite fluido integral as concentrações de bisfenol A foram de 0,53 ng/mL e 0,50 ng/mL, respectivamente. As demais 44 amostras ficaram abaixo do limite de detecção do método e cinco amostras (9,8%) acima do limite de detecção, mas abaixo do limite de quantificação.

Considerando o pior cenário possível, ou seja, crianças entre 1 semana e 12 meses de vida expostas exclusivamente ao leite em pó integral reconstituído (1:10) que apresentou maior nível de contaminação por bisfenol A, a ingestão diária estimada obtida para a faixa etária e sexo estaria inferior ao limite estabelecido pela EFSA. Porém é preciso salientar que existe uma limitação na obtenção dessas estimativas de exposição dietética por não contemplar outras fontes de exposição, como leite materno, água para consumo, vegetais e frutas, além das fontes não dietéticas que não foram levadas em consideração.

Apesar do nível de bisfenol A encontrado neste estudo tenha sido considerado seguro, a ocorrência de bisfenol A em leite merece atenção, uma vez que esse produto é muito consumido pela população e a exposição crônica ao bisfenol A tem sido relacionada a agravos à saúde.

Vale destacar que a contaminação desse alimento pode envolver toda a cadeia produtiva, desde a alimentação do animal, passando pela ordenha e chegando ao beneficiamento do leite. Creditar a contaminação do leite apenas a migração do bisfenol A a

partir da embalagem pode incorrer no erro, visto que muitas etapas podem contribuir para a contaminação do alimento.

Conclui-se que o método desenvolvido e validado pode servir como uma importante ferramenta de auxílio para estudos de avaliação da exposição ao bisfenol A pela ingestão de leite fluido integral (UAT e pasteurizado) e leite em pó integral.

## REFERÊNCIAS

ACCONCIA, F.; PALLOTTINI, V.; MARINO, M. Molecular mechanisms of action of BFA. **Dose-Response**, v.13, n. 4, p. 1-9, 2015.

ACKERMAN, L. *et al.* Determination of Bisphenol A in U.S. Infant Formulas: Updated Methods and Concentrations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 4, p. 2307-2313, 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Resolução nº 17, de 17 de março de 2008. Dispõe sobre regulamento técnico sobre lista positiva de aditivos para materiais plásticos destinados à elaboração de embalagens e equipamentos em contato com alimentos. 2008. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 18 de março de 2008. Disponível em: <http://migre.me/r3Wdb>. Acesso em: 01 ago. 2015.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Resolução nº 91, de 11 de maio de 2001. Aprovar o Regulamento Técnico - Critérios Gerais e Classificação de Materiais para Embalagens e Equipamentos em Contato com Alimentos constante do Anexo desta Resolução. 2001. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 15 de maio de 2001. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/\(1\)RDC\\_91\\_2001\\_COMP.pdf/fb132262e0a1-4a05-8ff7-bc9334c18ad3](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/(1)RDC_91_2001_COMP.pdf/fb132262e0a1-4a05-8ff7-bc9334c18ad3). Acesso em: 28 out. 2017.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Resolução RDC nº 41, de 16 de setembro de 2011. Dispõe sobre a proibição de uso de bisfenol A em mamadeiras destinadas a alimentação de lactentes e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 19 de setembro de 2011. 2011a. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0041\\_16\\_09\\_2011.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0041_16_09_2011.html). Acesso em: 21 out. 2017.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Resolução RDC nº 51, de 26 de novembro de 2010. Dispõe sobre migração em materiais, embalagens e equipamentos plásticos destinados a entrar em contato com alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 22 de dezembro de 2010. Disponível em: <https://www.diariodasleis.com.br/busca/exibelin.php?numlink=215704>. Acesso em: 23 out. 2017.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Resolução RDC nº 56, de 16 de novembro de 2012. Dispõe sobre a lista positiva de monômeros, outras substâncias iniciadoras e polímeros autorizados para a elaboração de embalagens e equipamentos plásticos em contato com alimentos. **Diário Oficial [da] União**. Brasília, DF, 21 de novembro de 2012. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/4048184/RDC\\_56\\_2012\\_.pdf/10f17ada-526e-434e-bc41-d0ec0b9e35cd](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/4048184/RDC_56_2012_.pdf/10f17ada-526e-434e-bc41-d0ec0b9e35cd). Acesso em: 13 jul. 2019.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. 2017b. 21p. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 25 de julho de 2017. Disponível em:

[http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC\\_166\\_2017\\_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401). Acesso em: 24 ago. 2019.

ALONSO, T. V. **Estudo da reação de formação de adutos gerados por resina epóxi e polialquileno glicóis**. 2013. 118f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

ALONSO-MAGDALENA, P. *et al.* Bisphenol A exposure during pregnancy disrupts glucose homeostasis in mothers and adult male offspring. **Environmental Health Perspectives**, v.118, n. 9, p. 1243–1250, 2010.

ALONSO-MAGDALENA, P. *et al.* The estrogenic effect of bisphenol A disrupts pancreatic beta-cell function in vivo and induces insulin resistance. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 1, p.106–112, 2006.

ALVES, C. *et al.* Exposição ambiental a desreguladores endócrinos com atividade estrogênica e sua associação com distúrbios puberais em crianças. **Caderno de Saúde Pública**, v. 23, n. 5, p. 1005-1014, 2007.

AMIN, M. M. *et al.* Association of exposure to bisphenol A with obesity and cardiometabolic risk factors in children and adolescents. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 29, n. 1, p.1-13, 2018.

ANASTASSIADES, M. *et al.* Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and ;Dispersive Solid-Phase Extraction; for the Determination of Pesticide Residues in Produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.

ANGLE B.M. *et al.* Metabolic disruption in male mice due to fetal exposure to low but not high doses of bisphenol A (BPA): evidence for effects on body weight, food intake, adipocytes, leptin, adiponectin, insulin and glucose regulation. **Reproductive Toxicology**, v. 42, p. 256–268, 2013.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. International, Official methods of analysis of AOAC International. **Guidelines for Standard Method Performance Requirements: Appendix F, p. 2**. Gaithersburg, 2016. 18 p.

AZEREDO, H. M. C. **Fundamentos de estabilidade de alimentos**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2012. 326p.

BAE, B.; JEONG, J. H.; LEE, S. J. The quantification and characterization of endocrine disruptor bisphenol-A leaching from epoxy resin. **Water Science and Technology**, v.46, n. 11/12, p.381-387, 2002.

BALLESTEROS-GÓMEZ, A.; RUBIO, S.; PÉREZ-BENDITO, D. Analytical methods for the determination os bisphenol A in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 3, p. 449-469, 2009.

BARRA, G. B. *et al.* Mecanismo molecular da ação do hormônio tireoideano. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v 48, n. 1, p. 25-39, 2004.

BATISTA, T. M. *et al.* Short-term treatment with bisphenol A leads to metabolic abnormalities in adult male mice. **Plos One**, v. 7, n. 3, p. 1-10, 2012.

BAZILIO, F. S. **Determinação da migração específica dos plastificantes ftalato de di-(2-etil-hexila) e adipato de di-(2-etil-hexila) de filmes flexíveis de pvc para alimentos gordurosos**: validação de método e controle sanitário do filme flexível de PVC. 2014. 142 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.

BEMRAH, N. *et al.* Assessment of dietary exposure to bisphenol A in the French population with a special focus on risk characterisation for pregnant French women. **Food and Chemical Toxicology**, v. 71, p. 90-97, 2014.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: Efeitos e consequências. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 651-666, 2007.

BILES, J. E., MCNEAL, T. P., BEGLEY, T. H. Determination of bisphenol A migrating from epoxy can coatings to infant formula liquid concentrates. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 45, p. 4697-4700, 1997.

BISPHENOL A. **Regulatory Framework**: national legislation. Europa, 2017. Disponível em: <http://bisphenol-a-europe.org/applications/food-packaging/>. Acesso em: 07 ago. 2018.

VENTURINI, K. S.; SARCINELLI, M. F.; SILVA, L. C. Processamento do leite. **Boletim Técnico PIE-UFES:02207**, Espírito Santo, 2007. 7 p.

BOMFIM, M. V. J. *et al.* Determinação de bisfenol A em fórmulas infantis. **Revista Visa em Debate**, v. 3, n. 3, p. 85-90, 2015.

BRASIL. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. 2017a. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 29 de março de 2017. Disponível em: <https://www.saude.rj.gov.br/comum/code/MostrarArquivo.php?C=NzU2NQ%2C%2C>. Acesso em: 10 ago. 2017.

BRASIL. Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 20 de setembro de 1990. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/L8080.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L8080.htm). Acesso em: 15 ago. 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018. Aprova os Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. **Diário Oficial [da] União**. Brasília, DF, 30 de novembro de 2018. 2018b. Disponível em: [http://www.in.gov.br/materia/-/asset\\_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/52750137/do1-2018-11-30-instrucao-normativa-n-76-de-26-de-novembro-de-2018-52749894IN%2076](http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/52750137/do1-2018-11-30-instrucao-normativa-n-76-de-26-de-novembro-de-2018-52749894IN%2076). Acesso em: 22 jul. 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 77, de 26 de novembro de 2018. Ficam estabelecidos os critérios e procedimentos para a produção, acondicionamento, conservação, transporte, seleção e recepção do leite cru. **Diário Oficial [da] União**. Brasília, DF, 30 de novembro de 2018. 2018a. Disponível em: [http://www.in.gov.br/materia/-/asset\\_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/52750141/do1-2018-11-30-instrucao-normativa-n-77-de-26-de-novembro-de-2018-52749887](http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/52750141/do1-2018-11-30-instrucao-normativa-n-77-de-26-de-novembro-de-2018-52749887). Acesso em: 08 jul. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Dez passos para uma alimentação saudável: guia alimentar para crianças menores de dois anos**: um guia para o profissional da saúde na atenção básica. 2. ed., 2 reimp. Brasília: MS; 2013. 72 p. Disponível em: <http://www4.planalto.gov.br/consea/comunicacao/dicas-de-leitura/dicas-de-leitura/leituras-domes-guia-alimentar-para-criancas-menores-de-dois-anos/guiaalimentarparacrianasmenoresdedoisanossegundaedio2013.pdf>. Acesso em: 01 ago. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia alimentar para a população brasileira**: promovendo a alimentação saudável. Brasília: MS; 2006. 210 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia alimentar para crianças menores de 2 anos**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2005. 152 p. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_alimentar\\_crianças\\_menores\\_2anos.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_alimentar_crianças_menores_2anos.pdf). Acesso em: 25 jul. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009**: análise do consumo alimentar pessoal no Brasil. Rio de Janeiro: IBGE, 2011b. 150 p. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv50063.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **VIGITEL BRASIL 2016**: Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília: Ministério da Saúde, 2017c. 106p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **VIGITEL BRASIL 2019**: Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília: Ministério da Saúde, 2019. 131p. Disponível em: <http://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/julho/25/vigite1-brasil-2018.pdf>. Acesso em: 30 jul. 2019.

BRAUN, J. M. *et al.* Impact of early-life bisphenol A exposure on behavior and executive function in children. **Pediatrics**, v. 128, n. 5, p. 873–882, 2011.

BRAUNRATH, R. *et al.* Determination of bisphenol A in canned foods by immunoaffinity chromatography, HPLC, and fluorescence detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 23, p. 8911-8917, 2005.

BRAUNRATH, R.; CICHNA, M. Sample preparation including sol-gel immunoaffinity chromatography for determination of bisphenol A in canned beverages, fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1062, n. 2, p. 189-198, 2005.

BROWN, M. B.; FORSYTHE, A. B. Robust Tests for the Equality of Variances. **Journal of the American Statistical Association**, v. 69, n. 346, p. 364-367, 1974.

CAO, X. L. (org.). **Chemistry and Analytical Methods for Determination of Bisphenol A in Food and Biological Samples**. Canadá: WHO, 2010. 30p.

CAO, X. L. *et al.* Concentrations of bisphenol A in the composite food samples from the 2008 Canadian total diet study in Quebec City and dietary intake estimates. **Food Additives & Contaminantes: Part A**, v. 28, n. 6, p. 791-798, 2011.

CAO, X. L., *et al.* Determinations of free and total bisphenol A in human milk samples from Canadian women using a sensitive and selective GC-MS method. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 32, n. 1, p. 120-125, 2015.

CARWILE, J. L.; MICHELS, K. B. Urinary bisphenol A and obesity: NHANES 2003-2006. **Environmental Research**, v. 111, n. 6, p. 825-830, 2011.

CASAJUANA, N.; LACORTE, S. New methodology for the determination of phthalate esters, bisphenol A, bisphenol A diglycidyl ether, and nonylphenol in commercial whole milk samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 12, p. 3702-3707, 2004.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.

CHOU, W. C. *et al.* Biomonitoring of bisphenol A concentrations in maternal and umbilical cord blood in regard to birth outcomes and adipokine expression: a birth cohort study in Taiwan. **Environmental Health**, v. 10, n. 94, p. 1-10, 2011.

CIRILLO, T. *et al.* Exposure to di-2-ethylhexyl phthalate, di-n-butyl phthalate and bisphenol A through infant formulas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 12, p. 3303-3310, 2015.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006.

COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS. Comissão: Decisão da Comissão N° 2002/657/CE, 12 de Agosto de 2002, que dá execução ao disposto na Directiva 96/23/CE do Conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados. **Jornal Oficial [da] União Europeia**, Bruxelas, L. 221/8, 12 agosto. 2002. 29p. Disponível em: <https://publications.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/ed928116-a955-4a84-b10a-cf7a82bad858/language-pt>. Acesso em: 22 jul. 2019.

COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS. Regulamento N° 08/2011, de 28 de janeiro de 2011. Modifica la Directiva 2002/72/CE no que se refere a restrição do uso de bisfenol A em mamadeiras de plástico para lactantes. **Jornal Oficial [da] União Europeia**, Bruxelas, L. 26, 29 jan. 2011. 2011b. 4p. Disponível em: < <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32011L0008&rid=4>>. Acesso em: 17 ago. 2018.



COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS. Regulamento de execução (EU) n° 321/2011, de 1 de abril de 2011, que altera o Regulamento (EU) n° 10/2011 no que diz respeito à restrição da utilização de bisfenol A em mamadeiras de plástico. **Jornal Oficial [da] União Europeia**, Bruxelas, L 87, 2 abr. 2011. 2011c. 2p. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32011R0321&from=EN>. Acesso em: 07 ago. 2018.

COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS. Regulamento (UE) N° 10/2011, 14 de Janeiro de 2011, relativo aos materiais e objectos de matéria plástica destinados a entrar em contacto com os alimentos. **Jornal Oficial [da] União Europeia**, Bruxelas, L. 12/1, 14 jan. 2011. 2011a. 89p. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:012:0001:0089:PT:PDF>. Acesso em: 26 out. 2017.

COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS. Regulamento (UE) N° 213/2018, de 12 de fevereiro de 2018, relativo à utilização de bisfenol A em vernizes e em revestimentos destinados a entrar em contato com os alimentos e que altera o Regulamento (UE) n° 10/2011 no que se refere à utilização desta substância em materiais de plástico destinados a entrar em contato com alimentos. **Jornal Oficial [da] União Europeia**, Bruxelas, L. 41, 14 fev. 2018. 7p. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32018R0213&from=EN>. Acesso em: 06 jun. 2018.

COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS. Regulamento (UE) N° 609/2013, de 12 jun. 2013, relativo aos alimentos para lactentes e crianças pequenas, aos alimentos destinados a fins medicinais específicos e aos substitutos integrais da dieta para controle do peso e que revoga a Diretiva 92/52/CEE do Conselho, as Diretivas 96/8/CE, 1999/21/CE, 2006/125/CE e 2006/141/CE da Comissão, a Diretiva 2009/39/CE do Parlamento Europeu e do Conselho e os Regulamentos (CE) n.o 41/2009 e (CE) n.o 953/2009 da Comissão. **Jornal Oficial [da] União Europeia**, Bruxelas, L. 181, 29 jun. 2013. 22p. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:181:0035:0056:PT:PDF>. Acesso em: 07 ago. 2018.

COUSINS, I. T. *et al.* A multimedia assessment of the environmental fate of bisphenol A. **Human and Ecological Risk Assessment**, v. 8, n. 5, p. 1107-1135, 2002.

COVACI, A. *et al.* Urinary BPA measurements in children and mothers from six European member states: overall results and determinants of exposure. **Environmental Research**, v. 141, p. 77-85, 2015.

CUNHA, S. C., *et al.* Determination of bisphenol A and bisphenol B in canned seafood combining QuEChERS extraction with dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 404, n. 8, p. 2453-2463, 2012.

DANAHER, M.; JORDAN, K. Identification of existing and emerging chemical residue contamination concerns in milk. **Irish Journal of Agricultural and Food Research**, v. 52, n. 2, p. 173-183, 2013.

DEBA, S.; NÚÑEZ, P. Efectos del bisfenol A em la reproducción femenina. **Medicina Reproductiva y Embriología Clínica**, v. 4, n. 1, p. 52-58, 2017.

DEKANT, W.; VÖLKEL, W. Human exposure to bisphenol A by biomonitoring: Methods, results and assessment of environmental exposure. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 228, n. 1, p. 114-134, 2008.

DURBIN, J.; WATSON, G. S. Testing for Serial Correlation in Least Squares Regression. II. **Biometrika**, v. 38, n. 1/2, p. 159-177, 1951.

EMBRAPA. **Indicadores: Leite e Derivados**, ano 8, n. 72, 2017. 19 p. Disponível: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/167787/1/Cnppl-2017-Indicadores-Leite-72.pdf>. Acesso em: 08 ago. 2018.

ERLER, C.; NOVAK, J. Bisphenol A Exposure: Human risk and health policy. **Journal of Pediatric Nursing**, v. 25, p. 400-407, 2010.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. **BPA update**: working group to start reviewing new studies. 2018. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/180904>. Acesso em: 22 jul. 2019.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission related to 2,2-BIS(4-HYDROXYPHENYL)PROPANE (Bisphenol A). **The EFSA Journal**, v. 428, p.1-75, 2006.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. **Technical Report**: Report on the two-phase public consultation on the draft EFSA scientific opinion on bisphenol A (BPA). 2015. 272P. Disponível em: <https://efsa.onlineibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/sp.efsa.2015.EN-740>. Acesso em: 06 ago. 2015.

FEDERAÇÃO DAS INDÚSTRIAS DO ESTADO DE SÃO PAULO. Informativo DEAGRO/FIESP: **Balança comercial brasileira do agronegócio: junho 2018**. São Paulo: FIESP, 2018. Disponível em: <http://www.fiesp.com.br/indices-pesquisas-e-publicacoes/balanca-comercial/attachment/file-20180716163809-bca2018/>. Acesso em: 10 ago. 2018.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento de alimentos**: princípios e prática. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 602 p.

FERREIRA, M. A. **Controle de qualidade físico-químico em leite fluído**. Brasília: SBRT/CDT/UnB, 2007. 18 p.

FLINT, S. *et al.* Bisphenol A exposure, effects, and policy: A wildlife perspective. **Journal of Environmental Management**, v. 104, p. 19-34, 2012.

FONTENELE, E. G. P. *et al.* Contaminantes ambientais e os interferentes endócrinos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 54, n. 1, p. 6-16, 2010.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Dairy Market review**. 2018. 8 p. Disponível em: <http://www.fao.org/3/I9210EN/i9210en.pdf>. Acesso em: 27 jul. 2019.

- FUJIMOTO, V. Y. *et al.* Serum unconjugated bisphenol A concentrations in women may adversely influence oocyte quality during in vitro fertilization. **Fertility and Sterility**, v. 95, n. 5, p. 1816–1819, 2011.
- GAO, C. *et al.* Bisphenol A in urine of Chinese young adults: concentrations and sources of exposure. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 96, n. 2, p. 162-167, 2016.
- GAO, G. *et al.* Simultaneous determination of bisphenol A and tetrabromobisphenol A in tea using a modified QuEChERS sample preparation method coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 48, n. 9, p. 6769-6776, 2017.
- GEENS, T. *et al.* A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol A. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n.10, p. 3725-3740, 2012.
- GEENS, T.; GOEYENS, L.; COVACI, A. Are potential sources for human exposure to bisphenol A overlooked? **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 214, n. 5, p. 339-347, 2011.
- GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Desreguladores endócrinos no ambiente. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 695-706, 2007.
- GROSHART, C, P.; OKKERMAN, P.C.; PIJNENBURG, A.M.C.M.(coord.) **Chemical study on bisphenol A**. Netherlands: Ministerie van Verkeer en Waterstaat, 2001. 97p.
- GRUMETTO, L. *et al.* Determination of five bisphenols in commercial milk samples by liquid chromatography Coupled to fluorescence detection. **Journal of Food Protection**, v. 76, n. 9, p. 1590-1596, 2013.
- GRÜN, F.; BLUMBERG, B. Environmental obesogens: organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signaling. **Endocrinology**, v. 147, n. 6, p. S50-S55, 2006.
- GRÜN, F.; BLUMBERG, B. Perturbed nuclear receptor signaling by environmental obesogens as emerging factors in the obesity crisis. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 8, n. 2, p. 161-171, 2007.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Introdução à endocrinologia. *In*: GUYTON A.C. **Tratado de Fisiologia Médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. Cap. 74, p. 706-713.
- HEINDEL, J. J. Animal models for probing the developmental basis of disease and dysfunction paradigm. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 102, n. 2, p. 76-81, 2008.
- HEINDEL, J. J. Endocrine disruptors and the obesity epidemic. **Toxicological Sciences**, v. 76, n. 2, p. 247-249, 2003.
- HIEMSTRA, M.; KOK, A. Comprehensive multi-residue method for the target analysis of pesticides in crops using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1154, n. 1-2, p. 3-25, 2007.

HOEKSTRA, E. J.; SIMONEAU, C. Release of bisphenol A from polycarbonate: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, n. 4, p. 386-402, 2013.

HORWITZ, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method performance studies. **Pure Applied Chemistry**. v. 67, n. 2, p. 331-343, 1995.

HORWITZ, W.; ALBERT, R. The Horwitz Ratio (HorRat): A Useful Index of Method Performance with Respect to Precision. **Journal of AOAC International**, v. 89, n. 4, p. 1095-1109, 2006.

HOWDESHELL, K. L. *et al.* Environmental toxins: Exposure to bisphenol A advances puberty. **Nature**, v. 401, n. 6755, p. 763-764, 1999.

HOWDESHELL, K. L. *et al.* Gestational and lactational exposure to ethinyl estradiol, but not bisphenol A, decreases androgen-dependent reproductive organ weights and epididymal sperm abundance in the male long Evans Hooded rat. **Toxicological Sciences**, v. 102, n. 2, p. 371-382, 2008.

HUGO, E. R. *et al.* Bisphenol A at environmentally relevant doses inhibits adiponectin release from human tissue explants and adipocytes. **Environmental Health Perspectives**, v. 116, n. 12, p.1642-1647, 2008.

IBGE. **Pesquisa trimestral do leite**: quantidade de leite cru adquirido e industrializado e variação, segundo os meses – Brasil – 2016-2017. 2017. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9209-pesquisa-trimestral-do-leite.html?=&t=downloads>. Acesso em 10 ago. 2018.

IBGE. **Pesquisa trimestral do leite**: quantidade de leite cru, resfriado ou não, adquirido e industrializado. 2018. Disponível em: <https://goo.gl/QWeqSm>. Acesso em: 29 maio 2018.

INOUE, K. *et al.* Determination of bisphenol A in human serum by high-performance liquid chromatography with multi-electrode electrochemical detection. **Journal of Chromatography B: Biomedical sciences and applications**, v.749, n.1, p.17-23, 2000.

INMETRO. **Orientações sobre validação de métodos de ensaio químicos**: DOQCGCRE-008: normatização e qualidade industrial. 7. rev.: Rio de Janeiro: INMETRO, 2018. Disponível em: [https://sogis.sogis.com.br/Arquivo/Modulo113.MRID109/Registro1295900/doq-cgcre-8\\_07.pdf](https://sogis.sogis.com.br/Arquivo/Modulo113.MRID109/Registro1295900/doq-cgcre-8_07.pdf). Acesso em: 13 jul. 2019.

JAMESON, J. L. Princípios de Endocrinologia. *In*: JAMESON, J. L. **Endocrinologia de Harrison**. 3. ed. São Paulo: AMGH, 2014. cap. 1, p. 1-10.

JANESICK, A. S.; BLUMBERG, B. Obesogens: na emerging threat to public health. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 214, n. 5, p. 559-565, 2016.

JUAN-GARCIA, A.; GALLEGO, C.; FONT, G. Toxicidade del bisfenol A: Revisión. **Revista de Toxicología**, v. 32, n. 2, p. 144-160, 2015.

KAISER, H. **The limit of detection of a complete analytical procedure**. London: Adam Hilger, 1968.

KANG, J. H.; KONDO, F. Determination of bisphenol A in milk and dairy products by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 8, p. 1439-1443, 2003.

KELLY, T. *et al.* Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. **International Journal of Obesity**, v. 32, n. 9, p. 1431-1437, 2008.

KHEDR, A. Optimized extraction method for LC-MS determination of bisphenol A, melamine and di(2-ethylhexyl) phthalate in selected soft drinks, syringes, and milk powder. **Journal of Chromatography B**, v. 930, p. 98-103, 2013.

KRISHNAN, Q. V. *et al.* Bisphenol-A: An estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. **Endocrinology**, v. 132, n. 6, p. 2279-2286, 1993.

KUIPER, G. G. J. M. *et al.* Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . **Endocrinology**, v. 138, n. 3, p. 863-870, 1997.

LANG, I. A. *et al.* Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 300, n. 11, p. 1303-1310, 2008.

LANGONI, H. *et al.* Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 12, p.1059-1065, 2011.

LEGEAY, S.; FAURE, S. Is bisphenol A an environmental obesogen? **Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 31, n. 6, p. 594-609, 2017.

LEGLER, J. *et al.* Obesity, diabetes, and associated costs of exposure to endocrine-disrupting chemicals in the European Union. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 100, n. 4, p. 1278-1288, 2015.

LEVENE, H. Robust tests for equality of variances. *In*: OLKIN, I; GHURYE, S.G.; HOEFFDING, W.; MADOW, W.G.; MANN, H.B. (ed.). **Contributions to probability and statistics**. Stanford University Press, p. 278-292, 1960.

LIAO, C.; KANNAN, K. A survey of bisphenol A and other bisphenol analogues in foodstuffs from nine cities in China. **Food Additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment**, v. 31, n. 2, p. 319-329, 2014.

LIAO, C.; KANNAN, K. Concentrations and profiles of bisphenol A and other bisphenol analogues in foodstuffs from the United States and their implications for human exposure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 19, p. 4655-4662, 2013.

LIU, X. *et al.* Elimination of matrix effects in the determination of bisphenol A in milk by solid-phase microextraction-high-performance liquid chromatography. **Food Additives & Contaminants**, v. 25, n. 6, p.772-778, 2008.

- MARAGOU, N. C. *et al.* Determination of bisphenol A in milk by solid phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1129, n. 2, p. 165-173, 2006.
- MASUNO, H. *et al.* Bisphenol A accelerates terminal differentiation of 3T3-L1 cells into adipocytes through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. **Toxicological Sciences**, v. 84, n. 2, p. 319-327, 2005.
- MASUNO, H. *et al.* Bisphenol A in combination with insulin can accelerate the conversion of 3T3-L1 fibroblasts to adipocytes. **Journal of Lipid Research**, v. 43, n. 5, p. 676-684, 2002.
- MATOS, S. M. A. *et al.* Velocidade de ganho de peso nos primeiros anos de vida e excesso de peso entre 5-11 anos de idade, Salvador, Bahia, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 27, n. 4, p. 714-722, 2011.
- MATTHEWS, J. B., TWOMEY, K., ZACHAREWSKI, T. R. *In vitro* and *in vivo* interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors alpha and beta. **Chemical Research in Toxicology**, v. 14, n. 2, p. 149-157, 2001.
- MERCOGLIANO, R.; SANTONICOLA, S. Investigation on bisphenol A levels in human milk and dairy supply chain: A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 114, p. 98-107, 2018.
- MIGEOT, V. *et al.* Bisphenol A and its chlorinated derivatives in human colostrum. **Environmental Science & Technology**, v. 47, n. 23, p. 13791-13797, 2013.
- MIYAWAKI, J. *et al.* Perinatal and postnatal exposure to Bisphenol A increases adipose tissue mass and serum cholesterol level in mice. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 14, n. 5, p. 245-252, 2007.
- MOLINA, P. E. **Fisiologia endócrina**. 4. ed. São Paulo: AMGH, 2014. 319p. Disponível em: <https://goo.gl/q9HGvA>. Acesso em: 03 out. 2017.
- MOURA, M. **Biologia a magia da vida: Comunicação celular**. 2012. Disponível em: <http://biologiaamagiadavida.blogspot.com/2012/09/comunicacao-celular.html>. Acesso em: 29 maio 2018.
- MUDIAM, M. K. R. *et al.* Application of ethyl chloroformate derivatization for solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometric determination of bisphenol A in water and milk samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 401, p. 1695-1701, 2011.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **PubChem Compound Database. Compound summary for CID 6623: Bisphenol A**. 2017. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6623> . Acesso em: 03 out. 2107.
- NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM (U.S.NTP). U.S. Department of Health and Human Services. **CLARITY-BPA Program**. 2019. Disponível em: <https://ntp.niehs.nih.gov/results/areas/bpa/>. Acesso em 22 jul. 2019.

NGUYEN, D. M.; EL-SERAG, H. B. The epidemiology of obesity. **Gastroenterology Clinical of North America**, v. 39, n. 1, p. 1-7, 2010.

NICHOLLS, S. G. Standards and classification: A perspective on the 'obesity epidemic'. **Social Science & Medicine**, v. 87, p. 9-15, 2013.

NIU, Y. *et al.* Bisphenol A and nonylphenol in foodstuffs: Chinese dietary exposure from the 2007 total diet study and infant health risk from formulas. **Food Chemistry**, v. 167, p. 320-325, 2015.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Health Topics: obesity**. 2015b. Disponível em: <http://www.who.int/topics/obesity/en/>. Acesso em: 29 jul. 2105.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **International Food Safety Authorities Network (INFOSAN) – Information Note n° 5/2009: Bisphenol A (BFA) – current state of knowledge and future actions by WHO and FAO**. 2009. Disponível em: [http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/No\\_05\\_Bisphenol\\_A\\_Nov09\\_en.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/No_05_Bisphenol_A_Nov09_en.pdf) Acesso em: 03 nov. 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Multicentre Growth Reference Study Group. WHO Child Growth Standards: Length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-for-height and body mass index-for-age: Methods and development**. Geneva: World Health Organization. 2006. 312 p.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Obesity and overweight: fact sheet n° 311 – Updated january 2015**. 2015a. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. Acesso em: 29 jul. 2015.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Obesity and overweight: key facts**. 2018. Disponível em: <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Acesso em: 29 maio 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals**. Geneva, Switzerland:World Health Organization; 2012. 296p.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Toxicological and health aspects of bisphenol A**. 2011. 60p. Disponível em: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44624/1/97892141564274\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44624/1/97892141564274_eng.pdf). Acesso em 13 out. 2017.

PONTELLI, R. C. N.; NUNES, A. A.; OLIVEIRA, S. V. B. Impacto na saúde humana de disruptores endócrinos presentes em corpos hídricos: existe associação com a obesidade? **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 21, n. 3, p. 753-766, 2016.

PRESTES, O. D. *et al.* QuEChERS–Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1620-1634, 2009.

PRZYBYLSKI, C.; SEGARD, C. Method for routine screening of pesticides and metabolites in meat based baby-food using extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 32, n. 11, p. 1858-1867, 2009.

RASTKARI, N; YUNESIAN, M; AHMADKHANIHA, R. Levels of bisphenol A and bisphenol F in canned foods in Iranian markets. **Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering**, v. 8, n. 1, p. 95-100, 2011.

ROCHESTER, J. R. Bisphenol A and human health: a review of the literature. **Reproductive Toxicology**, v. 42, p. 132-155, 2013.

RODRÍGUEZ-GÓMEZ, R. *et al.* New method for the determination of parabens and bisphenol A in human milk samples using ultrasound-assisted extraction and clean-up with dispersive sorbents prior to UHPLC–MS/MS analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 992, p. 47–55, 2015.

ROZENFELD, S. (org.). **Fundamentos da Vigilância Sanitária**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2000. 312p.

RUBIN, B. S. *et al.* Perinatal exposure to low doses of bisphenol A: Affects body weight, patterns of estrous cyclist, and plasma LH levels. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 7, p. 675-680, 2001.

RYAN, T.A.; JOINER, B.L. **Normal probability plots and tests for normality**. The States College: Pennsylvania State University. 1976. 15 p.

SAJIKI, J. *et al.* Bisphenol A (BPA) and this source in foods in Japanese markets. **Food Additives & Contaminants**, v. 24, n. 1, p. 103-112, 2007.

SARTORI, A. V. *et al.* Determination of Aflatoxins M1, M2, B1, B2, G1, and G2 and Ochratoxin A in UHT and Powdered Milk by Modified QuEChERS Method and Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 8, n. 9, p. 2321-2330, 2015.

SCHIMMELFENIG, C.; SANTOS, D. M.; BERNIERI, E. Inovação de embalagens. **Revista de Administração e Ciências Contábeis do Ideau**, v. 4, n. 9, p. 1-15, 2009.

SHANKAR, A.; TEPPALA, S. Relationship between urinary bisphenol A levels and diabetes mellitus. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 96, n. 12, p. 3822–3826, 2011.

SHAO, B. *et al.* Analysis of alkylphenol and bisphenol A in eggs and milk by matrix solid phase dispersion extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 850, n. 1-2, p. 412-416, 2007.

SHAO, B. *et al.* Determination of alkylphenol and bisphenol A in beverages using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 530, p. 245–252, 2005.



SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, W. G. **Statistical methods**. Ames: Iowa State University. 503 p., 1989.

SNYDER, R. W. *et al.* Metabolism and disposition of bisphenol A in female rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 168, n.3, p. 225-234, 2000.

SOBOLEVA, E.; AMBRUS, A. Application of a system suitability test for quality assurance and performance optimisation of a gas chromatographic system for pesticide residue analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1027, n. 1-2, p. 55-65, 2004.

SODRÉ, F. F. *et al.* Ocorrência de desreguladores endócrinos e produtos farmacêuticos em água superficiais da região de Campinas (SP, Brasil). **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 2, n. 2, p. 187-196, 2007.

SOMM, E. *et al.* Perinatal exposure to bisphenol A alters early adipogenesis in the rat. **Environmental Health Perspectives**, v. 117, n. 10, p. 1549-1555, 2009.

SOUZA S. V. C. **Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos**. 2007. 296 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos)-Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, n. 1-2, p. 25-35, 2005.

STAPLES, C. A. *et al.* A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. **Chemosphere**, v. 36, n. 10, p. 2149-2173, 1998.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for a single laboratory validation of methods of analysis. **Pure Applied Chemistry**, v.74, p. 835- 855, 2002.

TRASANDE, L.; ATTINA, T. M.; BLUSTEIN, J. Association between urinary bisphenol A concentration and obesity prevalence in children and adolescents. **Journal American Medical Association**, v. 308, n. 11, p. 1113-1121, 2012.

TSAKIRIS, I.N. *et al.* Comparative evaluation of xenobiotics in human and dietary milk: persistent organic pollutants and mycotoxins. **Cellular and Molecular Biology**, v. 59, n. 1, p. 58-66, 2013.

TUZIMSKI, T. *et al.* QuEChERS-Based Extraction Procedures for the Analysis of Bisphenols S and A in Breast Milk Samples by LC-QqQ-MS. **Journal of AOAC international**, v. 102, n. 1, p. 23-32, 2019.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Dairy**: world markets and trade. 2018. 25 p. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/dairy.pdf>. Acesso em 08 ago. 2018.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Special report on environmental endocrine disruption**: an effects assessment and analysis. 1997. Disponível em: <http://www.epa.gov/raf/publications/pdfs/ENDOCRINE.PDF>. Acesso em: 05 set. 2014.

VAN ASSELT, E. D. *et al.* Overview of food safety hazards in the european dairy supply chain. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 16, n. 1, p. 59-75, 2017.

VAN ESTERIK, J. C.J. *et al.* Programming of metabolic effects in C57BL/6JxFVB mice by exposure to bisphenol A during gestation and lactation. **Toxicology**, v. 321, p. 40-52, 2014.

VANDENBERG, L. N. *et al.* Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. **Endocrine Review**, v. 33, n. 3, p. 378-455, 2012.

VANDENBERG, L. N. *et al.* Urinary, circulating and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. **Environmental Health Perspectives**, v. 118, n. 8, p. 1055-1070, 2010.

VILELA, D. *et al.* A evolução do leite no Brasil em cinco décadas. **Revista de Política Agrícola**, v. XXVI, n. 1, p. 5-24, 2017.

VILELA, D. *et al.* (org.). **Pecuária de leite no Brasil: cenários e avanços tecnológicos**. Brasília: EMBRAPA, 2016. 438p.

VOM SAAL, F. S. *et al.* A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. **Toxicology and Industrial Health**, v. 14, n. 1-2, p. 239-260, 1998.

VOM SAAL, F. S. *et al.* The estrogenic endocrine disrupting chemical bisphenol A (BPA) and obesity. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 354, n. 1-2, p. 74-84, 2012.

WADA, K. *et al.* Life style-related diseases of the digestive system: endocrine disruptors stimulate lipid accumulation in target cells related to metabolic syndrome. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 105, n. 2, p. 133-137, 2007.

WALDMAN, E. A. **Vigilância epidemiológica como prática de Saúde Pública**. 1991. 176p. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1991.

WANDERLEY, E. N.; FERREIRA, V. A. Obesidade: uma perspectiva plural. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 15, n. 1, p. 185-194, 2010.

WANG, T. *et al.* Urinary Bisphenol A (BPA) concentration association with obesity and insulin resistance. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 97, n. 2, p. E223-E227, 2012.

WATABE, Y. *et al.* Determination of bisphenol A in environmental water at ultra-low level by high-performance liquid chromatography with an effective on-line pretreatment device. **Journal of Chromatography A**, v.1032, n. 1-2, p. 45-49, 2004.

WEI, J. *et al.* Perinatal exposure to bisphenol A at reference dose predisposes offspring to metabolic syndrome in adult rats on a high-fat diet. **Endocrinology**, v. 152, n. 8, p. 3049-3061, 2011.

- WETHERILL, Y. B. *et al.* In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. **Reproductive Toxicology**, v. 24, n. 2, p. 178-198, 2007.
- WITORSCH, R. J. Endocrine Disruptors: can biological effects and environmental risks be predicted? **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 36, n. 1, p. 118-130, 2002.
- WUTTKE, W.; JARRY, H.; SEIDLOVA-WUTTKE, D. Definition, classification and mechanism of action of endocrine disrupting chemicals. **Hormones**, v. 9, n. 1, p. 9-15, 2010.
- XIAO, G. B. *et al.* Effect of bisphenol A on semen quality of exposed workers: a pilot study. Chinese. **Journal of Industrial Hygiene and Occupational Diseases**, v. 27, n. 12, p.741-743, 2009.
- YAN, W. *et al.* Determination of estrogens and bisphenol A in bovine milk by automated on-line C<sub>30</sub> solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 7539-7545, 2009.
- YI, B.; KIM, C.; YANG, M. Biological monitoring of bisphenol A with HPLC/FLD and LC/MS/MS Assays. **Journal of Chromatography B**, v. 878, p. 2606-2610, 2010.
- YOSHIDA, T. *et al.* Determination of bisphenol A in canned vegetables and fruit by high performance liquid chromatography. **Food Additives & Contaminants**, v. 18, n. 1, p. 69-75, 2001.
- YOUNG, M. S.; MALLET, C. QuEChERS sample preparations for UPLC/MS/MS determinations of bisphenol A in infant formula. **Waters: Applique note**. 2012. 4p.
- ZIMMERS, S. M. *et al.* Determination of free Bisphenol A (BPA) concentrations in breast milk of U.S. women using a sensitive LC/MS/MS method. **Chemosphere**, v. 104, p. 237-243, 2014.

**APÊNDICE A – RELAÇÃO DAS AMOSTRAS DE LEITE FLUIDO INTEGRAL E LEITE EM PÓ INTEGRAL ANALISADAS**

Amostra	Marca	Produto	Tipo de embalagem	Amostra	Marca	Produto	Tipo de embalagem	Amostra	Marca	Produto	Tipo de embalagem
1	A	LP	Lata <sup>1</sup>	19	E	LF (UAT)	Tetra Pak <sup>3</sup>	37	T	LF (UAT)	PET <sup>4</sup>
2	B	LP	Lata <sup>1</sup>	20	J	LF (UAT)	Tetra Pak <sup>3</sup>	38	U	LF (UAT)	Tetra Pak <sup>3</sup>
3	C	LP	Lata <sup>1</sup>	21	K	LF (UAT)	Tetra Pak <sup>3</sup>	39	H	LP	Saco <sup>2</sup>
4	A	LP	Lata <sup>1</sup>	22	K	LF (UAT)	PET <sup>4</sup>	40	V	LP	Saco <sup>2</sup>
5	C	LP	Lata <sup>1</sup>	23	H	LP	Lata <sup>1</sup>	41	W	LP	Saco <sup>2</sup>
6	D	LP	Saco <sup>2</sup>	24	C	LP	Saco <sup>2</sup>	42	X	LF (UAT)	Tetra Pak <sup>3</sup>
7	E	LP	Saco <sup>2</sup>	25	L	LP	Saco <sup>2</sup>	43	Y	LF (UAT)	Tetra Pak <sup>3</sup>
8	F	LP	Saco <sup>2</sup>	26	M	LF (UAT)	Tetra Pak <sup>3</sup>	44	Z	LF (UAT)	Tetra Pak <sup>3</sup>
9	B	LP	Saco <sup>2</sup>	27	E	LF (UAT)	PET <sup>4</sup>	45	R	LF(Pasteurizado)	Saco <sup>5</sup>
10	G	LP	Saco <sup>2</sup>	28	D	LF (UAT)	Tetra Pak <sup>3</sup>	46	D	LF (UAT)	Tetra Pak <sup>3</sup>
11	H	LF(UAT)	Tetra Pak <sup>3</sup>	29	N	LF (UAT)	Tetra Pak <sup>3</sup>	47	K	LF (UAT)	Tetra Pak <sup>3</sup>
12	A	LF(UAT)	Tetra Pak <sup>3</sup>	30	B	LF (UAT)	Tetra Pak <sup>3</sup>	48	B	LP	Lata <sup>1</sup>
13	E	LF(UAT)	Tetra Pak <sup>3</sup>	31	O	LF (UAT)	Tetra Pak <sup>3</sup>	49	A	LP	Lata <sup>1</sup>
14	I	LF(UAT)	Tetra Pak <sup>3</sup>	32	P	LF (UAT)	Tetra Pak <sup>3</sup>	50	Aa	LP	Saco <sup>2</sup>
15	I	LF(UAT)	Tetra Pak <sup>3</sup>	33	Q	LF (UAT)	Tetra Pak <sup>3</sup>	51	R	LF(Pasteurizado)	Saco <sup>2</sup>
16	C	LF(UAT)	Tetra Pak <sup>3</sup>	34	R	LF(Pasteurizado)	Saco <sup>2</sup>				
17	C	LF(UAT)	Tetra Pak <sup>3</sup>	35	R	LF(Pasteurizado)	Saco <sup>2</sup>				
18	E	LF(UAT)	Tetra Pak <sup>3</sup>	36	S	LF(Pasteurizado)	Vidro <sup>6</sup>				

Fonte: (O autor, 2019).

Legenda: LP: Leite em Pó integral; LF: Leite Fluido integral; <sup>1</sup> Revestida por resina epóxi; <sup>2</sup> Poliéster Metalizado-Polietileno (filme laminado); <sup>3</sup> Cartonada; <sup>4</sup> Poli(tereftalato de etileno); <sup>5</sup> Polietileno (PE) e cloreto de polivinilideno (PVDC); <sup>6</sup> Vidro.