

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

Marcus Vinicius Justo Bomfim

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE BISFENOL A (BFA) EM FÓRMULAS INFANTIS E  
SUA CONTRIBUIÇÃO NA EXPOSIÇÃO DE LACTENTES**

Rio de Janeiro  
2015

Marcus Vinicius Justo Bomfim

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE BISFENOL A (BFA) EM FÓRMULAS INFANTIS E  
SUA CONTRIBUIÇÃO NA EXPOSIÇÃO DE LACTENTES**

Tese apresentada ao 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 Vigilância Sanitária.

Orientadoras: Shirley de Mello Pereira Abrantes  
Helena Pereira da Silva Zamith

Rio de Janeiro  
2015

Catálogo na fonte  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
Biblioteca

Bomfim, Marcus Vinicius Justo

Avaliação dos níveis de bisfenol A (BFA) em fórmulas infantis e sua contribuição na exposição de lactentes / Marcus Vinicius Justo Bomfim. Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2015.

144 f., il.

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, 2015.

Orientadoras: Shirley de Mello Pereira Abrantes, Helena Pereira da Silva Zamith

1. Espectrometria de Massas por Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz. 2. Controle de Qualidade. 3. Zona Controlada. 4. Preservação Biológica. I. Título

Assessment of bisphenol A levels in powder infant formula and its contribution to dietary exposure

Marcus Vinicius Justo Bomfim

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE BISFENOL A (BFA) EM FÓRMULAS INFANTIS E  
SUA CONTRIBUIÇÃO NA EXPOSIÇÃO DE LACTENTES**

Tese apresentada ao 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 Vigilância Sanitária.

Aprovado em 31/08/2015

**BANCA EXAMINADORA**

---

Isabella Fernandes Delgado (Doutora)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Mirian Ribeiro Leite Moura (Doutora)  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Prof. Dr. Marco Antonio Mota da Silva (Doutor)  
Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste

---

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

---

Dra. Helena Pereira da Silva Zamith (Doutora) - Orientadora  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



## **AGRADECIMENTOS**

A Profa. Dra SHIRLEY DE MELLO PEREIRA ABRANTES, do SETOR DE CONTAMINANTES ORGÂNICOS DO INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, pela orientação, incentivo, apoio, compreensão, paciência, confiança durante a realização do trabalho.

A Profa. Dra. HELENA PEREIRA DA SILVA ZAMITH, do DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA E TOXICOLOGIA DO INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, pela orientação, incentivo, apoio, compreensão e paciência ao longo do desenvolvimento do trabalho.

Ao técnico e amigo FÁBIO BAZILIO SILVESTRE DO SETOR DE CONTAMINANTES ORGÂNICOS do INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, pelo acolhimento, apoio, colaboração, paciência e amizade no período de trabalho e em outras ocasiões.

A funcionária ANGELA BARROSO pela colaboração, apoio, amizade durante o desenvolvimento do projeto.

Ao estagiário GEORGE pelo companheirismo, amizade, apoio e colaboração durante o desenvolvimento do trabalho e em outras ocasiões.

Ao DEPARTAMENTO DE QUÍMICA DO INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE representado por seus funcionários pelo apoio, colaboração, paciência durante o desenvolvimento de projeto.

Ao DEPARTAMENTO DE FARMACO-TOXICOLOGIA DO INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE representado por seus funcionários pelo apoio, colaboração, paciência durante o desenvolvimento de projeto.

A todos da COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO DO INSTITUTO NACIONAL DO CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE pela colaboração, compreensão e paciência.

Ao INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE pela oportunidade de direcionamento dos conhecimentos apreendidos ao longo de todos estes anos de estudo e a possibilidade de revertê-los em favor da saúde da população.

A FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ pela oportunidade e pelo apoio financeiro.

A FUNDAÇÃO CARLOS CHAGAS FILHO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO (FAPERJ) pela oportunidade e apoio financeiro no âmbito do programa Bolsa Nota 10, modalidade Doutorado.

A minha amada esposa GABRIELA FERREIRA JACQUES, por toda atenção, afeto, paciência, carinho, incentivo, amizade, companheirismo, compreensão e colaboração em todos esses anos de união o que permitiu um melhor desenvolvimento pessoal e profissional.

Aos meus sogros VERA FERREIRA JACQUES e GILSON CARDOSO JACQUES por toda atenção, afeto, paciência, carinho, incentivo e colaboração.

A meus grandes amores, meus pais, MARIA DE FÁTIMA JUSTO BOMFIM e LUIZ CARLOS FERREIRA BOMFIM, e minha irmã, PRISCILLA JUSTO BOMFIM, pelo apoio incondicional, compreensão, dedicação, pelas palavras, amor, carinho e ensinamentos ao longo dessa existência. Obrigado também pela transmissão de valores, princípios morais, éticos e humanos que nortearam suas vidas e que agora fazem parte da minha.

A todos os integrantes da família JUSTO E BOMFIM pela compreensão, apoio, colaboração, amor, carinho.

A DEUS pela paz, amor e ensinamentos, pelas amizades cultivadas e pela oportunidade de trilhar um caminho digno e honesto.

## RESUMO

Desreguladores endócrinos, como o bisfenol A (BFA), podem representar um sério risco toxicológico e de saúde pública, principalmente pela ação em baixas doses e, por isso tem recebido atenção da comunidade científica e de organizações relacionadas à segurança alimentar. É utilizado principalmente na produção de um tipo de plástico denominado policarbonato (PC) e na formação de resinas epóxi. O PC está presente em produtos de uso diário recipientes e materiais de cozinha e garrafas de água. As resinas epóxi são utilizadas como revestimento interno de latas de alimentos e bebidas. Em contato com o alimento, a substância pode ser transferida a partir do material plástico. O objetivo do trabalho foi determinar os níveis de BFA presentes em amostras de fórmula infantil em pó antes e após acondicionamento em mamadeiras de PC, contribuir com uma estimativa de exposição dietética em lactentes e desenvolver um ensaio toxicológico para avaliação da estrogenicidade de substâncias em útero isolado de ratas imaturas. Antes do contato com as mamadeiras de PC, as concentrações de BFA nas amostras de fórmulas infantis oscilaram entre 0,2 a 10,2 µg/kg da amostra. Após o ensaio de migração, as fórmulas experimentaram acréscimo médio de 16,5% em relação à concentração inicial. Os resultados obtidos atestam que as amostras analisadas estão abaixo do limite de migração específica (LME) para o BFA definido pela União Europeia e pelo Brasil. Nas faixas etárias estudadas, as estimativas de exposição dietética ao BFA indicaram níveis dez vezes inferiores aos calculados pelo *National Toxicology Program* (2008) e cinquenta vezes inferiores ao *European Food Safety Authority* (2006). Em relação a Ingestão diária tolerada, IDT, (EFSA, 2015), a exposição dietética ao BFA estimada no trabalho oscila entre valores de dezenove a oitenta vezes inferiores. O pior cenário de exposição dietética ao BFA em lactentes envolve a alimentação exclusiva por fórmulas infantis. Nesse estudo não foram considerados fontes de exposição como leite materno, água para consumo bem como frutas e vegetais. Contudo, a baixa exposição estimada não exclui a possibilidade de ocorrência de efeitos adversos sobre a saúde humana O cenário é complexo, envolve outras formas de exposição e ainda é alvo de preocupação de autoridades e entidades envolvidas com a prevenção de riscos e segurança alimentar. A preparação isolada de útero de rata obtida de ratas imaturas mostrou-se adequada para a detecção da estrogenicidade de substância de alta potência estrogênica como o 17 $\alpha$ - etinilestradiol (EE), nas doses testadas de 1,0 e

3,0 µg/kg p.c.. O não tratamento ou o pré-tratamento de ratas com óleo de milho, controle-solvente para o EE e o ftalato de dibutila não estimulou os receptores de ocitocina na preparação uterina. O pré-tratamento dos animais pelo BFA, considerado uma substância fracamente estrogênica, nas doses de 300 e 600 mg/kg p.c, induziu, respectivamente, aumento das respostas máximas de ocitocina de 2,4 X e 2,5 X nas preparações uterinas quando comparado ao controle-solvente, etanol 10%. Conclui-se que o BFA aumentou a eficácia da ocitocina na preparação uterina.

## ABSTRACT

Bisphenol A (BPA) is an endocrine disruptor and it may represent a serious toxicological and public health risk even at low doses exposure. This problem has received attention from the scientific community and organizations related to food safety. It is used mainly in the production of polycarbonate (PC) and the formation of epoxy resins. When in contact with food, the substance can be transferred from the plastic material to food. The objective was to determine the BPA levels present in samples of infant formula powder before and after contact with PC bottles, estimate a value of dietary BPA intake in infants and develop a toxicology assay to evaluate the estrogenicity of substances in isolated uterus of immature rats. The initial concentrations ranged from 0,2 to 10,2 mg/kg of sample. After the migration assay, the formulas had an increase of 16.5% compared to the initial concentration. The results show that the samples are below the specific migration limit of the BPA set by the European Union and Brazil. In the age groups, the estimates of dietary exposure to BPA indicated levels ten times lower than calculated by the National Toxicology Program (2008) and fifty times lower than calculated by European Food Safety Authority (2006). Regarding the tolerable daily intake (EFSA, 2015), the estimated dietary exposure of BPA in the study were nineteen to eighty times smaller. The worst scenario of dietary exposure to BPA in infants involves feeding with infant formula. This study did not consider other exposure sources such as breast milk, drinking water, fruits and vegetables. However, the low estimated exposure does not exclude the possibility of adverse effects on human health. The scenario is complex, it involves other forms of exposure and is still of concern to authorities target and entities involved in risk prevention and food safety. The preparation of isolated rat uterus obtained from female immature rats was adequate to detect the high power estrogenicity estrogenic substance such as 17 $\alpha$ - ethynylestradiol (EE) , at the tested doses of 1.0 and 3.0 mg/kg bw. The no treatment or pretreatment of rats with corn oil solvent control for the EE and dibutyl phthalate, not stimulated uterine oxytocin receptors on the preparation. Pretreatment of animals by BPA, considered a weakly estrogenic substance at doses of 300 and 600 mg / kg bw induced, respectively, increase maximal responses of oxytocin and 2.4 X 2.5 X in the uterine preparations when compared to the solvent control, ethanol 10%. It concludes that the BPA has increased the effectiveness of oxytocin on the uterine preparation.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C - Graus Celsius

µL – Microlitro

µg - Micrograma

AMB - Amostra com migração estimada que sofrerá adição do analito

ANOVA - Análise de variância

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BFA – Bisfenol A

BSTFA - N,O-bis (trimetilsilil)-trifluoroacetamida

CE – Comunidade Européia

CLAE-FL - Cromatógrafo líquido de alta eficiência com detecção por fluorescência

CG - DIC - Cromatógrafo a gás acoplado a detector de ionização em chama

CV - Coeficiente de variação

DIB-CL – *4-(4,5-Diphenyl-imidazol-2-yl)benzoyl chloride*

DNA - Ácido desoxirribonucléico

EE - 17α- etinilestradiol

EPA - *Environmental and Protection Agency*

EFSA – *European Food Safety Authority*

NTP – *National Toxicology Program*

EUA - Estados Unidos da América

FDD – Ftalato de dibutila

FI – Fórmula infantil

FT - Faixa de trabalho

FDA - *Food and Drug Administration*

d - Dias

h - Hora

IDT - Ingestão diária tolerável

kg - Quilograma

LME - Limite de migração específica

LOAEL - Menor nível de dose onde é observado efeito adverso

m<sup>3</sup> - Metro cúbico

mg - Miligrama

min - Minutos

mL - Mililitro  
mM - Concentração milimolar  
mm - Milímetro  
MMQO - Método dos mínimos quadrados ordinários  
MRC - Material de referência certificado  
MSTFA - N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida  
mU – miliunidades  
MTBSTFA - N- metil-N(t-butildimetilsilil)-trifluoroacetamida  
ng/L – nanograma por litro  
NOAEL - Nível de dose onde não é observado efeito adverso  
OECD - *Organisation for Economic Cooperation and Development*  
PC - Policarbonato  
PRSD<sub>r</sub> - *Within-laboratory predicted relative standard deviation*  
PRSD<sub>R</sub> - *Among-laboratory predicted relative standard deviation*  
pH - Potencial de Hidrogênio  
POP - Procedimento Operacional Padrão  
RNA - Ácido ribonucléico  
RSD<sub>r</sub> - *Within-laboratory relative standard deviation*  
RSD<sub>R</sub> - *Among-laboratory relative standard deviation*  
TEA – Trietilamina  
TMCS - Trimetilclorosilano  
UE - União Européia  
V79 - Células de pulmão de hamster chinês.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula estrutural do bisfenol A.....	18
Figura 2 - Demanda global de (a) policarbonato (2010 - 3,4 milhões tons) e (b) resinas epóxi (2009 - 1,8 milhões tons).....	20
Figura 3 - Desenho esquematizado acerca dos métodos de análise para determinação de BFA em alimentos.....	25
Figura 4 - Reação química entre o bisfenol A e derivatizante DIB-Cl.....	60
Figura 5 - Fluxograma para obtenção dos níveis de exposição de lactentes a partir da ingestão dietética de fórmulas infantis em pó antes/após acondicionamento em mamadeiras de PC.....	78
Figura 6 - Curva de crescimento (Peso x Idade) de meninos de 0-5 anos.....	80
Figura 7 - Curva de crescimento (Peso x Idade) de meninas de 0-5 anos.....	81
Figura 8 - Curva analítica do BFA em solvente (Área x Concentração em $\mu\text{g/L}$ ).....	85
Figura 9 - Gráfico de Durbin-Watson da curva analítica ( $e_i \times e_{i-1}$ ).....	87
Figura 10 - Curva analítica do BFA em matriz (área x concentração em $\mu\text{g/L}$ ).....	88
Figura 11 - (a) Cromatograma típico da amostra branca (AMB); (b) cromatograma típico de uma amostra fortificada correspondente ao nível de $4,5\mu\text{g/L}$ , $t_r = 9,94$ min.....	89
Figura 12 - Comparativo entre as estimativas de exposição dietética média calculadas e as estabelecidas pela EFSA (2006) e NTP (2008), em $\mu\text{g/kg p.c/dia}$ .....	99
Figura 13 - Comparativo entre as estimativas de exposição dietética média calculadas e estabelecidas pela EFSA (2006) e NTP (2008) após contato das fórmulas infantis com mamadeiras de policarbonato, em $\mu\text{g/kg p.c/dia}$ .....	100
Figura 14 - Efeito do pré-tratamento de ratas Wistar pelo $17\alpha$ -etinilestradiol (EE) nas contrações uterinas induzidas <i>in vitro</i> pela ocitocina (n=5). Respostas em (a) contração uterina em mm; (b) percentual do efeito máximo, % $E_{\text{máx}}$ .....	105
Figura 15 - Efeito do pré-tratamento de ratas Wistar pelo ftalato de dibutila (FDD) nas contrações uterinas induzidas <i>in vitro</i> pela ocitocina (n=2). Respostas em (a) contração uterina em mm; (b) percentual do efeito máximo, % $E_{\text{máx}}$ .....	106



Figura 16 - Efeito do pré-tratamento de ratas Wistar pelo bisfenol A (BPA) 300 e 600 mg/kg p.c em relação ao etanol 10% por via oral nas contrações uterinas induzidas *in vitro* pela ocitocina. Respostas em (a e c) contração uterina em mm; (b e d) percentual do efeito máximo, %  $E_{m\acute{a}x}$ .....111

Figura 17 - Efeito do pré-tratamento de ratas Wistar pelo BFA 300 (n=6) e 600 mg/kg p.c nas contrações uterinas induzidas *in vitro* pela ocitocina. Respostas em (a) contração uterina em mm; (b) percentual do efeito máximo, %  $E_{m\acute{a}x}$  .....113

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estimativas de exposição dietética da população segundo NTP, 2008.....	42
Tabela 2 - Estudos em animais expostos a baixas doses de BFA, administrados por via oral, durante o desenvolvimento.....	47
Tabela 3 - Análise de variância para significância da regressão ( $\alpha=0,05$ ).....	69
Tabela 4 - Peso considerado por faixa etária estudada, conforme OMS 2007).....	79
Tabela 5 - Resultados da análise de variância para significância da regressão ( $\alpha = 0,05$ ).....	87
Tabela 6 – Testes de premissas para curva analítica em matriz ( $\alpha = 0,05$ ).....	88
Tabela 7 – Resultados dos testes para avaliação do efeito matriz ( $\alpha = 0,05$ ).....	88
Tabela 8 – Avaliação da recuperação do método para cada nível de concentração.....	90
Tabela 9 – Resultados analíticos provenientes da determinação de bisfenol A em fórmulas infantis.....	91
Tabela 10 – Resultados analíticos provenientes da determinação de bisfenol A em fórmulas infantis após acondicionamento em mamadeiras de PC.....	93
Tabela 11 – Exposição dietética de lactentes ao BFA a partir de fórmulas infantis de partida, em $\mu\text{g}/\text{kg p.c}/\text{dia}$ .....	96
Tabela 12 - Exposição dietética de lactentes ao BFA a partir de fórmulas infantis de seguimento, em $\mu\text{g}/\text{kg p.c}/\text{dia}$ .....	97
Tabela 13 - Respostas obtidas para os ensaios de contração uterina induzidas <i>in vitro</i> pela ocitocina em ratas imaturas não tratadas (controle sem tratamento) e pré-tratadas por 3 dias consecutivos com óleo de milho por via oral.....	103
Tabela 14 - Respostas obtidas para os ensaios de contração uterina induzidas <i>in vitro</i> pela ocitocina em ratas imaturas pré-tratadas por 3 dias consecutivos com $17\alpha$ -etinilestradiol (EE) por via oral.....	104
Tabela 15 - Respostas obtidas para os ensaios de contração uterina induzidas <i>in vitro</i> pela ocitocina em ratas imaturas pré-tratadas por 3 dias consecutivos com o ftalato de dibutila (FDD) 1000 mg/kg p.c., por via oral.....	107
Tabela 16 - Respostas obtidas para os ensaios de contração uterina induzidas <i>in vitro</i> pela ocitocina em ratas imaturas pré-tratadas por 3 dias consecutivos com etanol 10% em água por via oral.....	109

Tabela 17 - Respostas obtidas para os ensaios de contração uterina induzidas <i>in vitro</i> pela ocitocina em ratas imaturas pré-tratadas por 3 dias consecutivos com bisfenol A (BFA) 300 mg/kg p.c, por via oral.....	110
Tabela 18 - Respostas obtidas para os ensaios de contração uterina induzidas <i>in vitro</i> pela ocitocina em ratas imaturas pré-tratadas por 3 dias consecutivos com bisfenol A (BFA) 600 mg/kg p.c, por via oral.....	112

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	18
1.1. Aplicações.....	19
1.2. Técnicas e métodos de análise.....	22
1.2.1. Contaminação ou <i>background</i> .....	22
1.2.2. Tratamento da amostra.....	23
1.2.3. Principais técnicas utilizadas.....	27
1.2.3.1. Cromatografia líquida de alta eficiência.....	27
1.2.3.1.1. Cromatografia líquida de alta eficiência acoplado à fluorescência.....	28
1.2.3.1.2. Cromatografia líquida de alta eficiência acoplado à espectrômetro de massas.....	29
1.2.3.2. Cromatografia gasosa acoplado a espectrômetro de massas.....	32
1.2.4. Validação de métodos analíticos.....	35
1.3. Níveis de exposição em humanos.....	36
1.3.1. Estimativas de exposição dietética em diferentes faixas etárias.....	36
1.3.1.1. Potencial de exposição alimentar em lactentes de 0-6 meses.....	36
1.3.1.2. Potencial de exposição em crianças de lactentes de 6-12 meses.....	39
1.3.1.3. Potencial de exposição em crianças de crianças pequenas.....	40
1.3.1.4. Potencial de exposição em adultos.....	41
1.3.2. Estimativas de exposição dietética em diferentes faixas etárias segundo NTP (2008).....	41
1.4. Estudos toxicológicos a partir de baixas doses de BFA.....	43
1.5. O caso BFA e a repercussão internacional.....	51
1.6. Justificativa.....	53
<b>2. Objetivos</b> .....	54
<b>3. Material e Métodos</b> .....	55
3.1. Método analítico.....	55
3.1.1. Material.....	55
3.1.2. Equipamentos.....	56
3.1.3. Reagentes e padrões.....	56
3.1.4. Soluções.....	57
3.1.5. Amostras.....	57
3.2. Método para determinação de BFA presentes nas fórmulas infantis em pó.....	58
3.2.1. Orientações para proteção individual e coletiva.....	58
3.2.2. Condicionamento do equipamento, detecção e quantificação.....	58

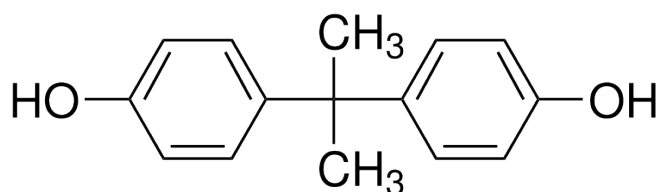
3.2.3. Método de análise.....	58
3.2.3.1.Extração por solventes/centrifugação/evaporação por N <sub>2</sub> .....	59
3.2.3.2. Ressuspensão/extração em fase sólida.....	59
3.2.3.3. Derivatização.....	60
3.2.3.4.Ensaio de migração com mamadeiras de PC.....	60
3.2.4. Caracterização do padrão e qualificação do equipamento.....	61
3.2.5. Validação intralaboratorial.....	61
3.2.5.1. Faixa de trabalho (FT).....	61
3.2.5.2. Linearidade.....	62
3.2.5.3. Efeito Matriz.....	69
3.2.5.4. Seletividade, Repetibilidade e Recuperação.....	71
3.2.5.5. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	74
3.2.6. Incerteza de Medição.....	74
3.3. Estimativa dos níveis de exposição diária de lactentes ao BFA.....	77
3.4. Revisão bibliográfica sobre a toxicologia do BFA.....	82
3.5. Ensaio toxicológico para avaliação da estrogenicidade de substâncias sobre útero.....	82
3.5.1. Animais.....	82
3.5.2. Procedimento experimental.....	83
<b>4. Resultados e Discussão.....</b>	<b>85</b>
4.1. Validação do método.....	85
4.1.1. Linearidade e curva analítica.....	85
4.1.2. Efeito matriz.....	87
4.1.3. Seletividade.....	89
4.1.4. Repetibilidade.....	90
4.1.5. Recuperação.....	90
4.1.6. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	91
4.2. Resultados analíticos das fórmulas infantis.....	91
4.3. Resultados analíticos após ensaio de migração com mamadeiras de PC.....	93
4.4. Estimativa de exposição dietética em lactentes.....	95
4.5. Resultados do ensaio toxicológico.....	100
<b>5. Conclusão.....</b>	<b>115</b>
<b>6. Perspectivas.....</b>	<b>117</b>
<b>7. Referências.....</b>	<b>118</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Na dinâmica complexa dos processos são gerados muitos riscos e danos à saúde do indivíduo e da coletividade, assim como ao meio ambiente e à economia do consumidor. Portanto, nota-se a necessidade de regulação das relações de produção e consumo; reconhece-se a vulnerabilidade do consumidor e se criam instrumentos para proteger a saúde da coletividade. As ações de Vigilância Sanitária se inserem no âmbito das relações sociais de produção e consumo, onde se origina a maior parte dos problemas de saúde sobre os quais é preciso interferir. Ou seja, a Vigilância Sanitária atua sobre fatores de risco associados a produtos, insumos e serviços relacionados com a saúde, com o ambiente e o ambiente de trabalho (ROZENFELD, 2000).

A embalagem e alguns materiais em contato com os alimentos atuam como barreira de proteção para o produto contra o contato direto com o ambiente, evitando alterações indesejáveis. Entretanto, a própria embalagem ou material plástico pode representar fonte de risco através da migração de substâncias de sua própria constituição para o alimento (MIDIO; IZUMIDA, 2000). E o bisfenol A, o 4,4-dihidroxi-2,2-difenilpropano, pode ser uma delas. (Figura 1). Possui fórmula molecular  $C_{15}H_{16}O_2$ ; massa molecular, 228,29 g/mol; 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 (NTP, 2008).

Figura 1 – Fórmula estrutural do bisfenol A (Fonte: EFSA, 2006)



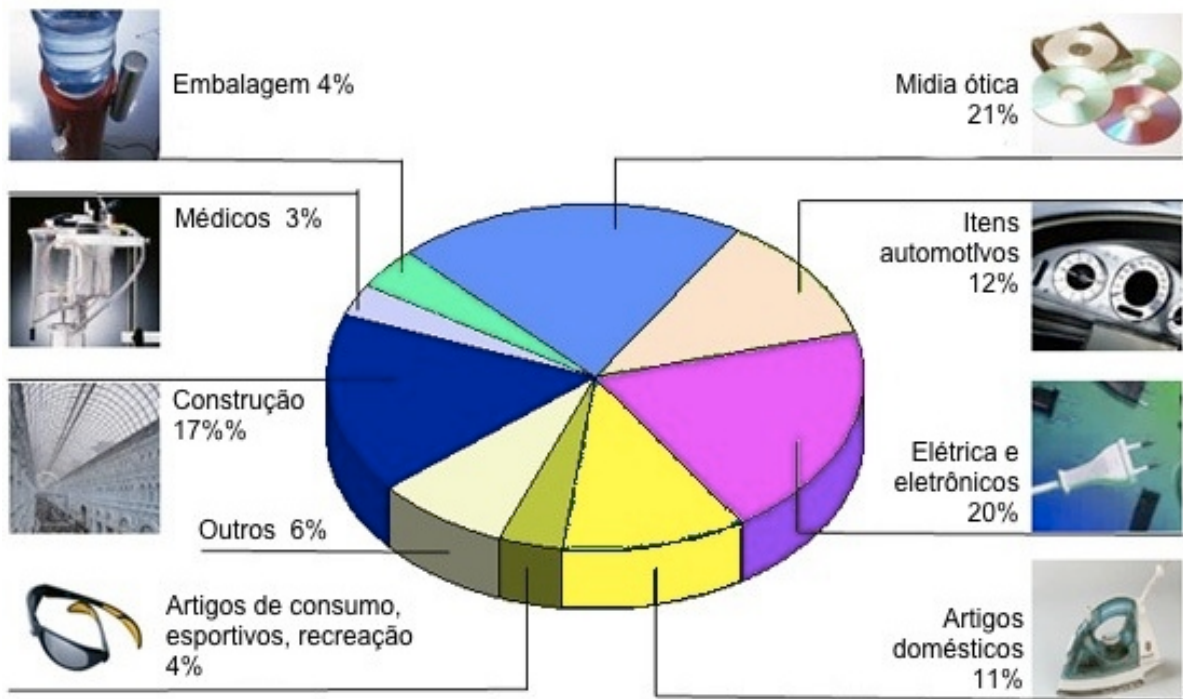
## 1.1 Aplicações

O bisfenol A (BFA) é usado principalmente como um monômero para a produção de policarbonato (PC), e como um precursor para os monômeros de certas resinas epoxi. O PC é amplamente utilizado em artigos em contato com alimentos, tais como mamadeiras infantis, utensílios de mesa (pratos, canecas, jarras, copos), recipientes de armazenamento e para microondas, água retornável e garrafas de leite (usado principalmente no Norte da Europa) e recipientes de água reutilizáveis ("garrafões" utilizados em escritórios, hospitais) (MAIA et al., 2009). As resinas epóxi-fenólicas são utilizadas como revestimento interno de tampas metálicas, de latas de alimentos e bebidas, e em tonéis para a produção de bebidas alcoólicas (Figura 2). Resinas epóxi-fenólicas são geralmente formados por reação de BADGE (bisfenol A diglicil éter) com o BFA (RUNYON, et al., 2002). As resinas epóxi são aplicados no interior das latas e depois aquecidas a temperaturas elevadas para outras reações e ligações cruzadas. Tampas de metal para frascos de vidro e frascos são frequentemente revestidos com uma resina epóxi-fenólica (EFSA, 2006). O revestimento é particularmente importante durante o processo, transporte e armazenamento, pois, caso contrário, existiria maior interação entre o alimento e o metal da lata, elevando a probabilidade de contaminação dos alimentos, de corrosão do recipiente e de alteração das características sensoriais do produto (ACKERMAN et al., 2010). Segundo a indústria, o BFA não é utilizado como um agente de reticulação na Europa para revestimento de latas. Por outro lado, fenólicos reticulantes, que contêm BFA residual, são usados na Europa, em certa medida, para revestimento de latas. Há algumas aplicações de BFA como acelerador de endurecedores à base de amina para resinas epoxi. Esses endurecedores não são usados em revestimentos de latas, porém em revestimentos resistentes à corrosão para

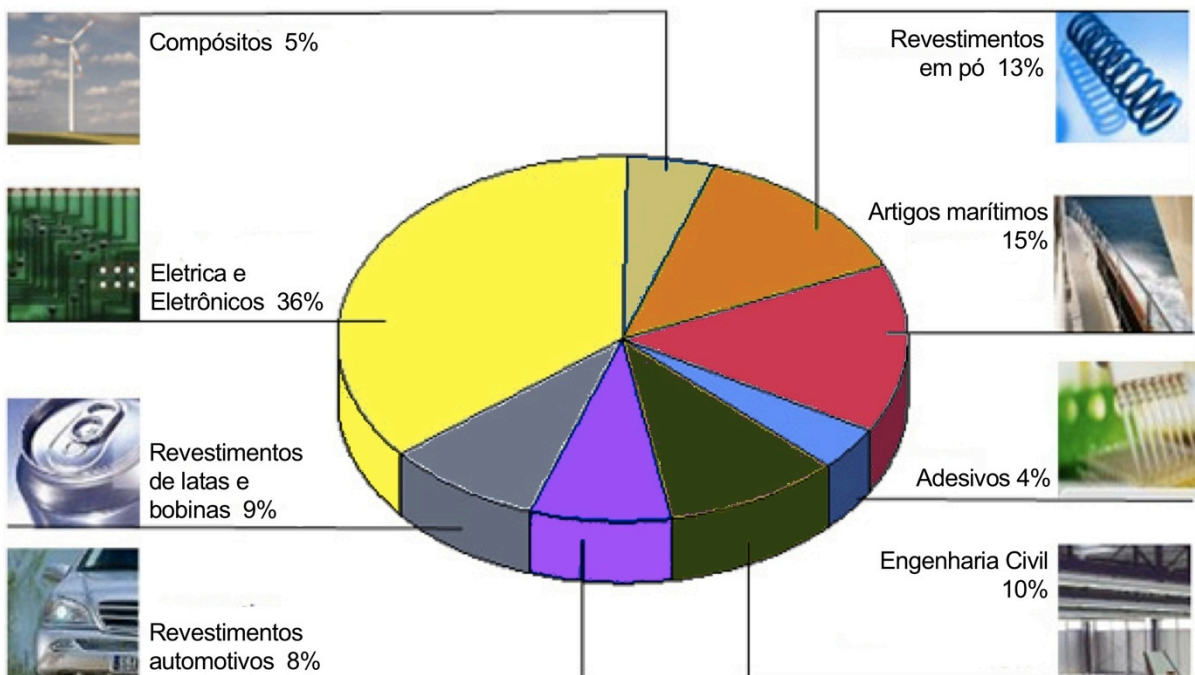
tanques, tubulações e pisos (ASSOCIATION OF PLASTICS MANUFACTURERS IN EUROPE, 2006a).

Figura 2 – Demanda global de (a) policarbonato (2010 - 3,4 milhões tons) e (b) resinas epóxi (2009 - 1,8 milhões tons). Fonte: European Information Centre on Bisphenol A, 2013.

(a)



(b)





Algumas aplicações menos usuais de BFA incluem as resinas fenoplástico, resinas de poliéster insaturado, polióis/poliuretanos e poliamidas modificadas para revestimentos de latas. O BFA também foi encontrado em filmes e lonas de plástico de policloreto de vinila (PVC) na Espanha e estudos sugerem a migração de BFA para os alimentos (LOPEZ-CERVANTES; PASEIRO-LOSADA, 2003; LOPEZ-CERVANTES et al., 2003). Assim, a European Food Safety Authority (EFSA) solicitou à Associação dos Fabricantes de Plásticos da Europa para investigar o uso de BFA em PVC. A aplicação de BFA no processo de polimerização do PVC por alguns fabricantes na União Européia parece ter cessado (ASSOCIATION OF PLASTICS MANUFACTURERS IN EUROPE, 2006a). A utilização do BFA como estabilizador e antioxidante em PVC também foi investigado. A única formulação incluindo BFA foi encontrado para ser usado para juntas de tampas de garrafa de metal vendidas fora da União Européia. Assim, a exposição ao BFA a partir do contato com alimentos com PVC não deve ser esperada. (ASSOCIATION OF PLASTICS MANUFACTURERS IN EUROPE, 2006b)

Segundo alguns autores, a borracha natural ou sintética (silicone) usado para produzir os bicos de alimentação e chupetas para bebê podem conter BFA, já que os plásticos são frequentemente misturadas com borrachas para modificar as suas propriedades (OZAKI; BABA, 2003). Em um estudo isolado por Tan e Mustafa (2003), o BFA foi observado em bicos disponíveis no mercado na Malásia. No entanto, a Associação Mundial de Fabricantes de mamadeiras e bicos foi contatada e afirmou que o BFA não é e nunca foi utilizado na fabricação de bicos (ASSOCIATION OF PLASTICS MANUFACTURERS IN EUROPE, 2006c). Portanto, a exposição ao BFA pelo contato de alimentos com a borracha natural ou sintética não deve ser esperada.

Um campo especial de uso potencial de BFA está em materiais em contato com água para consumo humano. O PC é usado para tubos de água e as resinas epóxi - fenólicas são largamente usadas como superfície de revestimento de tanques de

armazenamento de água potável residenciais (BAE et al., 2002). Essa utilização deve ser considerada na avaliação da exposição alimentar ao BFA.

Dessa forma, a migração para os alimentos de resíduos de BFA presentes no revestimento interno de enlatados, em mamadeiras, garrafas de água e recipientes plásticos de policarbonato poderia representar um risco à saúde pública, sendo necessários avaliação, controle e monitoramento do mesmo.

## **1.2. Técnicas e métodos de análise**

### **1.2.1. Contaminação ou background**

O BFA é inerentemente onipresente no meio ambiente. A contaminação por BFA ou *background* ocorre em níveis da ordem de ng/L e decorre, principalmente, de solventes, colunas de extração em fase sólida (EFS), copos, utensílios de plástico e outros reagentes e instrumentos de laboratório. Em geral, os artigos de vidro tratados termicamente (4h em 400 °C ) e os materiais lavados com solvente são utilizados como uma medida de precaução para evitar a contaminação (SHAO et al., 2007a) .

Concentrações de BFA em torno de 0,02 µg/L foram encontrados em água Milli-Q utilizando métodos altamente sensíveis (INOUE et al.,2000; WATABE et al., 2004a; WATABE et al., 2004b). A contaminação surgiu a partir do plástico usado no sistema de purificação e foi removido pela água através de uma membrana hidrofóbica (disco Empore®). No entanto, alguns autores não relataram quaisquer contaminação por BFA em diferentes águas ultra/alta qualidade, tais como água Pestanal®, da Riedel-de Haen ou aquelas obtidas de sistemas Elgastast e Milli-Q da Millipore, em experimentos com limites de quantificação da ordem de 10 ng (CARABIAS-MARTINEZ et al., 2006) .

Há relatos de que cartuchos de extração em fase sólida (por exemplo, Oasis HLB, da Waters e Bond Elut Certificy, da Varian) podem causar a contaminação BPA em

concentrações de cerca de 0,04 g/L (INOUE et al., 2000). A contaminação foi eficazmente removida por pré-lavagem dos cartuchos com, pelo menos, 15 mL de metanol. Ainda, o procedimento por extração em fase sólida pode introduzir forte contaminação com BFA pela utilização de seringas de vidro, relacionada ao adesivo de fixação da agulha (WATABE et al., 2004; CARABIAS-MARTINEZ et al.,2006). Usando uma bomba peristáltica com tubos de PVC, a contaminação com BFA tornou-se insignificante, embora a contaminação fora importante para dois derivados de BFA (ácido 4 - terc - butilbenzóico e 4-terc-butilfenol). A contaminação na EFS durante a fase de carregamento da amostra pode ser eliminada parcialmente através da substituição dos tubos de PVC por tubos de Viton® da DuPont (CARABIAS-MARTINEZ et al.,2006).

### **1.2.2. Tratamento da amostra**

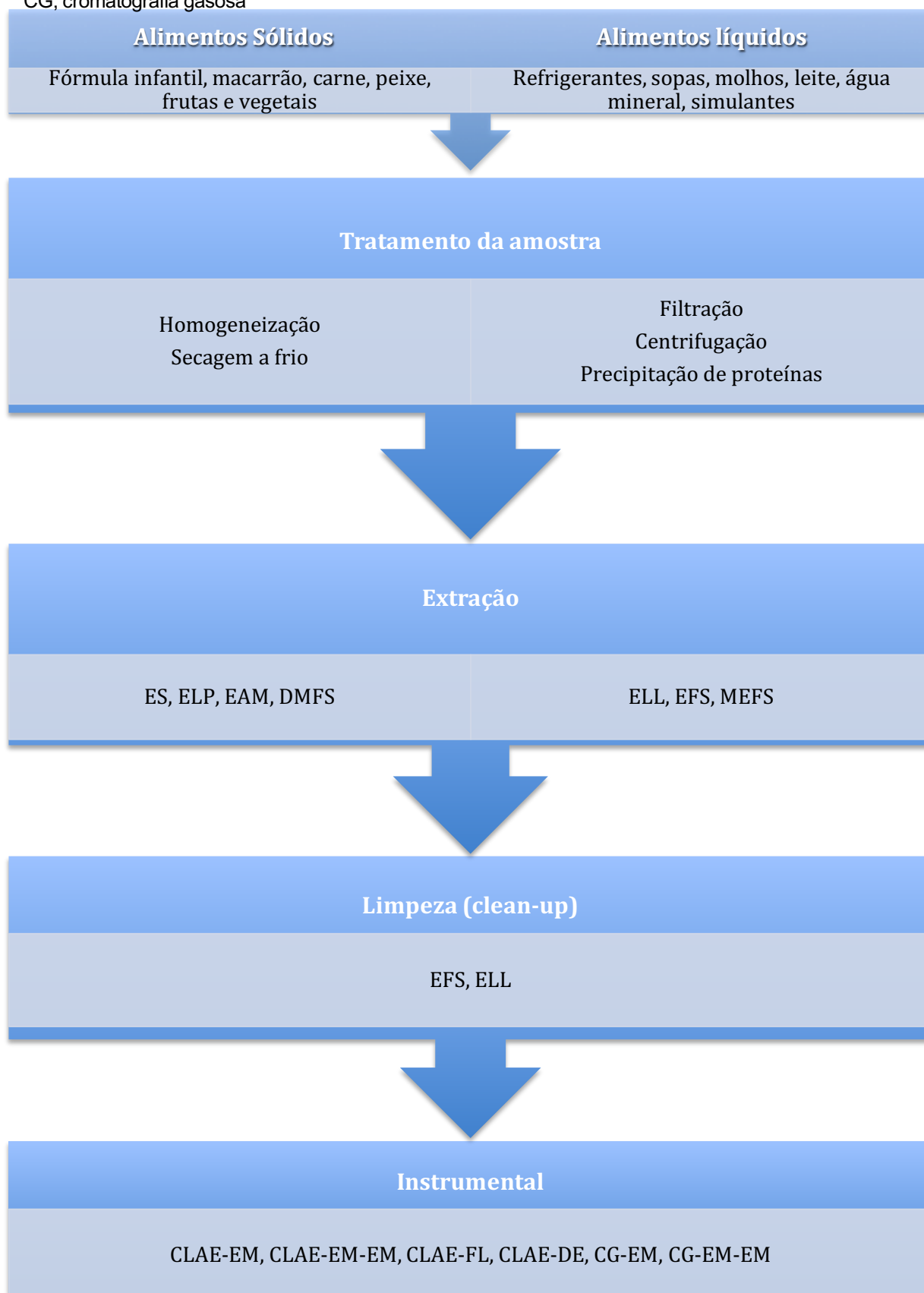
Há uma grande variedade de alimentos que podem conter BFA, incluindo amostras sólidas e líquidas, frescas ou enlatados. A determinação do BFA nessas matrizes , muitas vezes requer uma preparação intensa da amostra previamente a análise instrumental. As etapas comuns no preparo de amostras de alimentos incluem pré-tratamento, extração, limpeza, concentração e , por vezes, derivatização (Fig. 3). As amostras sólidas são geralmente homogeneizadas e as líquidas filtradas e/ou centrifugadas. Outro tipo de procedimento pode ser necessário dependendo da constituição das amostras, por exemplo, como a remoção de proteínas por precipitação em amostras proteicas (GOODSON et al., 2002; VARELIS; BALAFAS, 2000).

A extração com solventes e EFS são as técnicas mais amplamente utilizadas para o isolamento de BFA de amostras sólidas e líquidas principalmente por causa da sua simplicidade e aplicabilidade. Outras técnicas, apesar de pouco utilizadas, podem minimizar quantidade de amostra e consumo de solventes, além de automatizar o processo. Os extratos contendo BFA são geralmente sujeitos a fases de limpeza e, neste

caso, a extração líquido-líquido e EFS são as mais utilizadas. A concentração de BFA por evaporação do solvente do extrato final é um passo inevitável devido à sua baixa concentração em alimentos. Em geral, a combinação de diferentes técnicas é usualmente inevitável e métodos tornam-se frequentemente matriz dependente. Apenas os métodos destinados a estudar a migração de BFA em latas comerciais não utilizadas ou “virgens” por solventes que simulam alimentos são mais simples (MUNGUÍA-LOPEZ; SOTO-VALDEZ, 2001; LÓPEZ-CERVANTES; PASEIRO-LOSADA, 2003; D’ANTUONO et al., 2001; WINGENDER et al., 1998). A figura 3 apresenta alguns procedimentos já relatados na literatura.

A extração com solventes (ES) ainda é a técnica mais comum para o isolamento de BFA dos alimentos sólidos. A extração líquido-líquido (ELL) tem sido utilizada com menor frequência do que a EFS. A maioria dos métodos de extração foram desenvolvidos para matrizes específicas de alimentos, como peixe (GYONG et al., 2007; MUNGUÍA-LÓPEZ et al., 2005), frutas e vegetais (YOSHIDA et al., 2001; KANG et al., 2006), iogurte, creme de leite, manteiga, de fórmulas infantis em pó (KUO e DING, 2004), ração (KANG; KONDO, 2002) e água mineral (TOYO’OKA; OSHIGE, 2000). A quantidade de amostra necessária para a extração de BFA a partir de alimentos sólidos e líquidos variam de 0,5 a 30 g, sendo 5,0 g a mais empregada (MUNGUÍA-LÓPEZ et al., 2005; YOSHIDA et al., 2001; KANG et al., 2006; KANG ; KONDO, 2002; TOYO’OKA; OSHIGE, 2000) e 10 a 50 mL (BILES et al., 1997; GOODSON et al., 2002; THOMSON; GROUNDS, 2005; VARELIS ; BALAFAS, 2000), respectivamente.

Figura 3 – Desenho esquematizado acerca dos métodos de análise para determinação de BFA em alimentos. Legenda: ES, extração por solvente; ELP, extração líquida pressurizada; EAM, a extração assistida por microondas; DMFS, dispersão da matriz em fase sólida; ELL, extração líquido-líquido; EFS, extração em fase sólida; MEFS, microextração em fase sólida; CLAE, cromatografia líquida de alta eficiência; EM, espectrômetro de massas; FL, detecção de fluorescência; DE, detecção eletroquímica; CG, cromatografia gasosa



Os trabalhos geralmente utilizam a acetonitrila para extração de alimentos sólidos (BILES et al., 1997; GOODSON et al., 2002; MUNGUÍA-LÓPEZ et al., 2005; YOSHIDA et al., 2001; KANG; KONDO, 2002; KANG; KONDO, 2003; SUN et al., 2006) embora a acetona (KANG et al., 2006), o metanol (MUNGUÍA-LÓPEZ et al., 2002; MUNGUÍA-LÓPEZ et al., 2005) e o etanol (KUO e DING, 2004) também tenham sido utilizados de forma satisfatória. Os alimentos líquidos são extraídos com acetato de etila (TOYO'OKA; OSHIGE, 2000), clorofórmio (BROTTONS et al., 1995) ou diclorometano (VARELIS; BALAFAS, 2000). Como regra geral, extrações repetidas geralmente são necessárias para garantir o completo isolamento de BFA. O consumo de solvente, incluindo as extrações repetidas e lavagem, é entre 40 e 300 mL. Os tempos de extração variam de 10 min a 120 min utilizando agitação ou ultrassom para favorecer a partição.

Devido à seletividade limitada de extrações à base de solventes, há uma grande necessidade de limpeza antes da injeção. A remoção dos lípidios a partir do extrato é essencial para as amostras de origem animal (por exemplo, peixe, carne, leite, fórmulas infantis), uma vez que pode reduzir significativamente o desempenho analítico da CLAE e CG. O material lipídico afeta a superfície ativa da fase estacionária na CLAE e degrada o poder de resolução da coluna. Em CG-EM, a gordura pode acumular na porta de injeção, na coluna e na fonte de ionização. A remoção de gordura é composta principalmente por extração líquido-líquido com n-heptano (BILES et al., 1997), trimetilpentano (THOMSON; GROUNDS, 2005) e n-hexano (MUNGUÍA-LÓPEZ et al., 2005; YOSHIDA et al., 2001; SUN et al., 2006) ou através do congelamento dos lípidios no extrato a -24 °C por 40 min seguido por filtração (GYONG et al., 2007). A utilização de EFS para *clean-up* dos extratos contendo BFA torna-se inevitável na maior parte dos procedimentos de tratamento de amostra (GYONG et al., 2007; YOSHIDA et al., 2001; KANG et al., 2006; KANG ; KONDO, 2002; KUO e DING, 2004; KANG; KONDO, 2003). Depois disso, a evaporação do material eluído,

reconstituição com solvente orgânico e filtração (0,20-0,5 µm) completam o tratamento da amostra. Em sua maioria, os trabalhos apresentam recuperações acima de 75%, porém estudos como de Thomson e Grounds (2005) e Kuo e Ding (2004) observaram recuperações inferiores a 50% atribuídas à interações matriz-analito.

### 1.2.3. Principais técnicas utilizadas

Em razão dos níveis frequentemente encontrados e da complexidade das matrizes, a determinação de BFA em alimentos requer a utilização de técnicas altamente sensíveis e seletivas. Embora o limite de migração específica (LME) definido pela União Européia e pelo Brasil (UE, 2011b; BRASIL, 2011) seja relativamente alto, 0,6 mg/kg de alimento, os resultados experimentais de rotina induziram ao desenvolvimento de métodos analíticos em níveis de µg/kg ou inferiores. A determinação do BFA em alimentos é realizada principalmente por CLAE-FL (KANG et al., 2006; KANG ; KONDO, 2002; SUN et al., 2006; INOUE et al., 2003; BRAUNRATH ; CICHNA, 2005; BRENN-STRUCKHOFOVA ; CICHNA-MARKL, 2006; NERÍN et al., 2002) CLAE-EM-EM ( SHAO et al., 2007a; SHAO et al., 2005; SHAO et al., 2007b) e CG-EM-EM (SALAFRANCA et al., 1999; VARELIS ; BALAFAS, 2000; D'ANTUONO et al., 2001; KUO e DING, 2004; THOMSON ; GROUNDS, 2005; CHANG et al., 2005). Outras técnicas, como a detecção electroquímica (CLAE- DE) e os imunoenaios foram utilizados em menor extensão.

#### 1.2.3.1. Cromatografia líquida de alta eficiência

As técnicas de CLAE para determinação de BFA utilizam colunas octadecil (C18) de fase reversa. Fases móveis variam de acordo com o detector acoplado. Água e acetonitrila são os solventes comuns quando a detecção de fluorescência é usada, enquanto a água e metanol são os preferidos para ionização por *electrospray* (ESI) - EM e ionização química sob pressão atmosférica (APCI)-EM. Gradientes de eluição são

dependentes das matrizes em análise e da necessidade de separação e detecção do BFA com outros fenóis, desreguladores endócrinos e migrantes de embalagens de alimentos (CARABIAS-MARTÍNEZ et al., 2006; KANG ; KONDO, 2003; TOYO'OKA ; OSHIGE, 2000; SHAO et al., 2005). Os tempos de intervalo entre 15 (CARABIAS-MARTÍNEZ et al., 2006 ) e 40 min (SHAO et al., 2005), dependendo do número de contaminantes determinados e composição da matriz. O método é realizado à temperatura ambiente, mas temperaturas de até 40 °C são por vezes recomendadas (CARABIAS-MARTÍNEZ et al., 2006; SHAO et al., 2005) para diminuir o tempo de análise e aumentar a reprodutibilidade .

#### 1.2.3.1.1 . Cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a fluorescência (CLAE-FL)

O BFA mostra fluorescência nativa com comprimentos de onda de excitação e emissão de 275 e 305nm , respectivamente, que mantêm constante nos solventes mais freqüentemente utilizados em fases móveis, ou seja, água, acetonitrila e metanol (KANG et al., 2006; KANG; KONDO, 2002; SUN et al., 2006; INOUE et al., 2003; BRAUNRATH ; CICHNA, 2005; BRENN-STRUCKHOFOVA; CICHNA-MARKL, 2006; NERÍN et al., 2002). A intensidade de fluorescência de BFA é, no entanto, muito mais elevada em meios orgânicos e, portanto, sua sensibilidade será dependente da composição da fase móvel (BALLESTEROS-GÓMEZ et al., 2009).

A técnica já foi empregada para a determinação de BFA em diferentes matrizes alimentares, tais como bebidas, vinhos, ração, mel, frutas, legumes e peixes (KANG et al., 2006; KANG; KONDO, 2002; SUN et al., 2006; INOUE et al., 2003; BRAUNRATH; CICHNA, 2005; BRENN-STRUCKHOFOVA; CICHNA-MARKL, 2006). A preparação das amostras normalmente inclui limpeza utilizando EFS não seletivo baseado em adsorvente (KANG et al., 2006; KANG ; KONDO, 2002; SUN et al., 2006; INOUE et al., 2003), colunas de imunoafinidade (BRAUNRATH; CICHNA, 2005; BRENN-



STRUCKHOFOVA; CICHNA-MARKL, 2006) ou microextração em fase sólida seguido de evaporação do solvente (NERÍN et al., 2002). Limites de detecção típicos para BFA em alimentos que utilizam a detecção de fluorescência está na gama de 0,1 - 2 µg/kg e 1 - 5 µg/kg. Os limites de quantificação instrumentais típicos para BFA por detecção por fluorescência oscilam entre 5-50 µg/L (KANG et al., 2006; KANG; KONDO, 2002; SUN et al., 2006; INOUE et al, 2003; BRAUNRATH; CICHNA, 2005; BRENN-STRUCKHOFOVA; CICHNA-MARKL, 2006).

A identificação de BFA na amostra se baseia apenas nos tempos de retenção. Dessa forma, a possibilidade de interferência de outros migrantes fluorescentes de revestimentos de latas, por exemplo, bisfenol A diglicidil éter (BADGE) , bisfenol F diglicidil éter (BFDGE) ou novolacas glicidil éteres (NOGE) (BIEDERMANN; GROB, 1998; LINTSCHINGER; RAUTER, 2000) deve ser considerada, pois podem produzir resultados equivocados. Não obstante, a confirmação por CLAE-EM depois de quantificação por fluorescência já foi utilizada (INOUE et al., 2003).

#### 1.2.3.1.2. Cromatografia líquida acoplada a espectrometro de massa (CLAE-EM)

O uso de espectrometria de massa pode reduzir o tratamento da amostra. No entanto, uma preparação adequada da amostra ainda pode ser necessária nos métodos de CLAE-EM, pois a presença de componentes da matriz podem reduzir a eficiência da ionização e o sinal/ruído. Esse fato interferiria na detecção e limites de quantificação do método. Métodos para a determinação de BFA baseados na CLAE-EM apresentam maior confiabilidade na identificação do analito se comparados aqueles com CLAE-FL e CLAE-DE. Se comparados aos CG-EM, apresenta vantagem pois dispensa a necessidade de uma etapa de derivatização (BALLESTEROS-GOMÉZ et al., 2009).

As principais interfaces de análise por EM são a ionização por *eletrospray* (ESI) e de ionização química à pressão atmosférica (APCI ), ambos em modo negativo. A ESI é

usada mais freqüentemente que APCI porque geralmente oferece melhor sensibilidade. Assim, os limites de quantificação instrumentais para BFA de 5 µg/L (MARAGOU et al., 2006) e 20,7 µg/L (MENDIOLA et al., 2007) foram relatados utilizando ESI e APCI, em modo negativo, respectivamente. Em ambos os estudos foi empregado um analisador de massa quadrupolo. Utilizando ESI (-) e um analisador de massa triplo quadrupolo, o limite de quantificação diminuiu até 1 ng/mL (volume injetado da amostra: 10 µL) (SHAO et al., 2005, SHAO et al., 2007a; COVACI; VOORSPOELS, 2005). A resposta do ESI-EM é fortemente dependente da composição da fase móvel (SHAO et al., 2005; MARAGOU et al., 2006). Assim, as fases móveis a partir de metanol/água demonstraram maior resposta de soluções padrão de BFA do que aqueles consistindo de acetonitrila/água, devido ao ponto de ebulição mais baixo do anterior, o que favoreceu a dessolvatação das gotículas de eletropulverização (MARAGOU et al., 2006). A resposta em acetonitrila/água aumentou 3 a 4 vezes sob a adição de modificadores como 0,5% (MOTOYAMA et al., 1999) e de 0,01 % de amônia ou de 0,01 % de ácido acético (MARAGOU et al., 2006). Em oposição a esses estudos, a presença de aditivos em fases móveis metanol/água tem sido conhecida em diminuir a resposta de BFA. Assim, os aditivos básicos, que foram adicionados para promover desprotonação do BFA, resultou em supressão da ionização (BENIJTS et al., 2004; GALLART-AYALA et al., 2007), e a adição de hidróxido de amônio (0,01 % em água) ou de ácido acético (0,01 % em água) diminuiu o sinal de 1,5 e 3 vezes para soluções padrão de BFA e leite, respectivamente (MARAGOU et al., 2006). No entanto, em alguns casos, o efeito oposto tem sido relatado. A adição de 0,1 % de amônia para metanol/água aumentaram a resposta de BFA (SHAO et al., 2005).

A maioria dos métodos com espectrometria de massas (EM) incluem a adição de um padrão interno (PI) para superar perdas de preparação de amostras e efeitos de matriz (de supressão ou de melhoria do sinal), que levam a um método de baixas

recuperações absolutas. Os padrões internos mais utilizados foram 4-nonilfenol (quando alquilfenóis também foram determinados), BFA-  $d_{16}$  e isótopo  $^{13}C_{12}$ -BFA. A importância da utilização de padrão interno foi destacado por Maragou e colaboradores (2006), que superou as perdas causadas pela supressão do sinal (em torno de 20%) e aqueles gerados durante a preparação da amostra (estimada em cerca de 28% ), utilizando-se o padrão interno de BFA  $d_{16}$ . Deste modo, a recuperação média relativa do método foi de 101 % (recuperação média absoluta de 52%).

Independentemente do tipo de analisador e fonte de ionização, o íon mais abundante no espectro de massa de BFA foi  $[M-H]^-$   $m/z$  227. Os espectros obtido com os instrumentos quadrupolo também continham os ions de fragmento  $m/z$  211 e 212, formados por perda adicional de oxigênio,  $[M-H-O]^-$  e um radical metila,  $[M-H-CH_3]^{\bullet-}$ , respectivamente. Usando fases móveis de acetonitrila - 0,01 % de  $NH_3$  em água , um ion com  $m/z$  113 foi detectado no espectro de massa do BFA, que foi relacionada com a perda de ambos os prótons ácidos  $[M-2H]^{2-}$ . O  $[M-H-CH_3]^{\bullet-}$   $m/z$  212 foi o produto mais proeminente dos fragmentos obtidos por CLAE-EM-EM, e por isso, sua utilização para confirmação e/ou quantificação de BFA (SHAO et al., 2005; CARABIAS-MARTÍNEZ, 2006; SHAO et al., 2007a).

Aplicações de CLAE-ESI(-)EM para a determinação da BFA incluem cereais (CARABIAS-MARTÍNEZ et al., 2006) e leite (MARAGOU et al., 2006), enquanto CLAE-EM-EM foi utilizado para a análise de água e bebidas refrigerantes (SHAO et al., 2005), a carne (SHAO et al., 2007a) e leite e ovos (SHAO et al., 2007b), após extração líquida pressurizada (CARABIAS-MARTÍNEZ et al., 2006; SHAO et al., 2007b) e a EFS (SHAO et al., 2005). Limites de detecção do método variam de 0,7-43  $\mu g/kg$  e 0,001-3  $\mu g/kg$  para EM e EM-EM, respectivamente (CARABIAS-MARTÍNEZ et al., 2006; SHAO et al., 2007b; SHAO et al., 2005; MARAGOU et al., 2006). Os dois métodos com APCI (-)

realizam o tratamento da amostra: o primeiro usa MAE (extração assistida por microondas) para extração do BFA presente em peixes, seguido de análise em CLAE-EM (PEDERSEN; LINDHOLST, 1999). Os limites de detecção oscilaram de 0,1 a 50 µg/kg (YE et al., 2006).

#### 1.2.3.2. Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM)

A cromatografia à gás acoplada a espectrômetro de massas proporciona uma maior resolução e limites de detecção inferiores aos CLAE-EM para a determinação de BPA em alimentos, embora a necessidade de uma etapa de derivatização torne os métodos baseados em CG extensos e introduz novas fontes de erros, principalmente devido a contaminação. Outro aspecto relevante é que a presença de gordura pode reduzir de forma significativa o desempenho analítico de CG (DODO ; KNIGHT, 1999; ORAZIO et al., 1989), o que implica na necessidade de uma etapa de limpeza adequada e eficiente, como em amostras de peixes (MUNGUÍA-LÓPEZ et al., 2005). Como os métodos baseados em CLAE-EM, a utilização de um padrão interno é comum, sendo BFA d<sub>16</sub> e BFA d<sub>14</sub> os substitutos mais utilizados (GYONG et al., 2007; BASHEER et al., 2004).

A CG-EM com impacto de elétrons (EI) tem sido amplamente utilizado para a confirmação do BPA em análise de alimentos. A derivatização do BFA não é necessária para esta aplicação (BILES et al., 1997a; D'ANTUONO, 2001; MUNGUÍA-LÓPEZ et al., 2001; BILES et al., 1997). O pico de base neste espectro corresponde à perda de um grupo metila ( [ C<sub>14</sub> H<sub>13</sub> O<sub>2</sub> ]<sup>+</sup>, m/z 213 ) a partir do íon molecular ( [ C<sub>15</sub> H<sub>16</sub> O<sub>2</sub> ]<sup>•+</sup>, m/z 228). Uma via de menor fragmentação alternativa envolve a perda de um dos grupos aril do íon molecular para dar um carbocátion terc-benzílico ( [C<sub>9</sub> H<sub>8</sub> O]<sup>+</sup>, m/z 135).

A quantificação do BFA por CG-EM requer a derivatização do analito de modo a melhorar a sua separação e detecção. A inclusão de um passo de derivatização ocasiona picos mais nítidos de BFA, a melhor separação de outros componentes da matriz e os analitos co-extraídos e maior sensibilidade (concentrações inferiores a  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) (WINGENDER et al., 1998). A silanização e acetilação foram os processos de derivatização mais utilizados, realizados por adição de 100 a 200  $\mu\text{L}$  do reagente correspondente ao extrato seco e aguardando o repouso durante 30 a 60 min a temperatura ambiente ou a 65 - 80  $^{\circ}\text{C}$ . A silanização de hidrogênios ativos de BFA é feito principalmente com bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) contendo 1 % de trimetilclorosilano (TMCS) (WINGENDER et al., 1998; BASHEER et al., 2004; CHANG et al., 2005). A adição de TMCS favorece a formação de um único derivado, produzindo as razões massas/carga 357 e 372 (KUO e DING, 2004; CHANG et al., 2005). A silanização também pode ser realizada a partir de N', N'- metil-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA) e N', N' - metil - (terc-butildimetilsilil) trifluoroacetamida (MTBSTFA) (GYONG et al., 2007). Ambos os reagentes produzem derivados com íons de diagnóstico para a caracterização e identificação. Os íons característicos são  $[\text{M} - 15]^+$ , em m/z 357 e 441, respectivamente. Estes íons podem ser utilizados na quantificação de BFA no modo “*selective ion monitoring*” (SIM) . Os íons moleculares provenientes da derivatização com MSTFA (m / z 372) e MTBSTFA (m/z 456) foram utilizados para confirmação do analito de interesse. Não houve diferença no rendimento de reação e respostas entre eles, mas o MTBSTFA promoveu uma estabilidade de armazenamento superior (estável após 8 dias, enquanto o derivado TMS caiu para 60% devido à hidrólise neste momento). Além disso , o tempo de retenção do derivado oriundo da reação com MTBSTFA foi maior do que para a MSTFA (41 e 37 min, respectivamente), o qual resultou numa melhor separação entre os picos (GYONG et al., 2007).

Acetilação dos grupos hidroxí do BFA com anidrido acético (GOODSON et al., 2002; THOMSON; GROUNDS, 2005) ou anidrido trifluoroacético (VARELIS; BALAFAS, 2000) é outro procedimento frequente para obtenção de derivados de BFA para CG-EM. O padrão de fragmentação do derivado O-bis (trifluoroacetil) incluiu um pico base do espectro correspondente ao íon fragmento  $[M - 15]^+$  (m/z 405) formado a partir do íon molecular (m/z 420) com a perda de um grupo metila. Comprovou-se que o derivado O-bis(trifluoroacetil) de BFA foi mais sensível do que o derivado trimetilsilil correspondente, em virtude de sua massa molecular superior. A massa molecular mais elevada proporciona uma relação sinal/ruído maior (VARELIS; BALAFAS, 2000).

A derivatização do padrão interno (por exemplo, BFA  $d_{14}$ ) é considerada essencial para manutenção da sua pureza isotópica durante a separação cromatográfica sobre uma coluna capilar de sílica fundida (VARELIS ; BALAFAS, 2000). O referido padrão interno degrada pela troca dos prótons de deutério ( $^2\text{H-H}$ ) na porção aromática da molécula. Este fenómeno ocorre igualmente em outros fenóis monodeuterados (MAHMOUD, 1996) e foi atribuído à troca eletrofílica na porção aromática de átomos de deutério com átomos de hidrogénio ativos situados na superfície interna da coluna (ALDER ET AL., 1978). Embora o derivado de TMS e BFA-deuterado reduza a perda de pureza isotópica, a utilização do derivatizante O-bis (trifluoroacetil) é preferida para evitar a troca  $^2\text{H-H}$  na coluna, uma vez que a sua estabilidade é superior (VARELIS ; BALAFAS, 2000) e, além disso, como anteriormente citado para a BFA, a sua massa molecular mais elevada bem como a natureza monoisotópica de flúor torna este derivado mais sensível .

O CG-EM é a técnica mais sensível para a determinação de BFA em alimentos . Stuart e colaboradores (2005) compararam os limites de detecção (LD) obtidos por diferentes técnicas e os valores obtidos foram de 0,8 ng/g para CG-EM sem derivatização, 0,004 ng/g para CG-EM utilizando o derivatizante metílico (0,5 M de solução de hidróxido de feniltrimetilamónio), 1,6 ng/g para CLAE- UV (275 nm) e de 1,0

ng/g por CLAE - ESI( - ) - EM. O menor limite de detecção (0,51 pg/g) foi avaliado por meio de um derivado de acetilico (JIN et al., 2004). Por outro lado, os limites de detecção do métodos variam de 0,0063 a 0,4 ng/g (BALLESTEROS-GÓMEZ et al., 2009).

#### **1.2.4. Validação de métodos analíticos**

Vários laboratórios realizam, diariamente, mensurações analíticas que dão suporte às decisões dos mais diferentes setores da economia e da sociedade. O desenvolvimento tecnológico e científico aliado ao fenômeno da globalização ampliaram a necessidade de obtenção de medidas analíticas confiáveis e comparáveis, com vista ao reconhecimento mútuo e redução de barreiras técnicas entre os países. Nesse contexto, os laboratórios devem adotar medidas cabíveis que assegurem a qualidade requerida para seus resultados analíticos. Tais medidas seriam a utilização de métodos validados, procedimentos de controle de qualidade interna, participação de ensaios de proficiência e acreditação (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). No que diz respeito à área de alimentos, a validação de métodos relaciona-se somente à segurança alimentar e ao comércio internacional.

É notório que a validação por procedimentos interlaboratoriais está bem estabelecida por meio de estudos colaborativos. Contudo, os estudos não são capazes de acompanhar a demanda por garantia de qualidade e a velocidade dos avanços técnicos e científicos. Razões como questões técnicas, organizacionais, infraestruturais e financeiras podem ser enumeradas. As limitações de validações por estudos colaborativos praticamente conduzem os laboratórios à adoção de procedimentos para validação intralaboratorial, atualmente considerados apropriados para avaliar parâmetros de desempenho de um método (SOUZA, 2007). Da mesma forma, é internacionalmente reconhecido como alternativa quando não há disponibilidade de procedimento interlaboratorial ou quando os procedimentos não

são aplicáveis (THOMPSON, ELLISON e WOOD, 2002). A validação intralaboratorial diz respeito a estudos analíticos que envolvem um único laboratório, utilizando um mesmo método para analisar a mesma amostra, sob diferentes condições, em um intervalo de tempo justificado (UE, 2002)

### **1.3. Níveis de exposição em humanos**

A exposição do consumidor ao BFA pode ocorrer através da exposição oral ou dérmica. Somente a exposição a partir da alimentação tem sido considerada, incluindo a exposição através da água potável que poderia conter BFA devido à sua presença em tubulações ou tanques de armazenamento.

A exposição oral decorre do consumo de alimentos e bebidas (exposição alimentar). Em geral, para estimar a exposição através da dieta, os dados sobre a migração de BFA em alimentos e simuladores de alimentos são combinados com dados sobre o consumo de alimentos. A avaliação tem como objetivo fornecer estimativas conservadoras de exposição, ou seja, em altos percentis da distribuição, através da combinação de níveis elevados de migração BFA com altos níveis de consumo de alimentos (EFSA, 2006).

#### **1.3.1. Estimativas de exposição dietética em diferentes faixas etárias (EFSA, 2006)**

##### ***1.3.1.1. Potencial de exposição alimentar em lactentes de 0-6 meses***

A exposição alimentar potencial em bebês de 0-6 meses deve ser avaliada de acordo com o seu padrão de consumo. Bebês nesta faixa etária estão sujeitos a uma série de situações que implicam em cenários distintos no que tange sua alimentação. Sua dieta pode (e deve) contemplar exclusivamente o leite materno ou, em casos específicos, abranger exclusivamente fórmulas infantis. O último caso ocorre em situações onde o



leite materno pode oferecer risco ao lactente, como em casos de infecções maternas com agentes de alta patogenicidade ou que exijam uso de medicamentos incompatíveis com a amamentação. A infecção por HIV é o exemplo mais representativo dessa recomendação (ACCIOLY et al., 2002). As fórmulas infantis de partida ou para lactentes são definidas pela legislação brasileira como “produto, em forma líquida ou em pó, utilizado sob prescrição, especialmente fabricado para satisfazer, por si só, as necessidades nutricionais dos lactentes sadios durante os primeiros seis meses de vida (5 meses e 29 dias)” (BRASIL, 2011).

A EFSA adotou um cenário de consumo alimentar baseado no estudo DONALD (KERSTING, 1998) para estimar os níveis de exposição em faixas etárias determinadas. Neste trabalho, um bebê de 3 meses, pesando em média 6,1 kg e consumindo 174 ml/kg de peso corporal /dia de fórmula infantil (percentil 95 de consumo de 1060 ml/dia , com base numa razão de reconstituição de 135 g/L de fórmula líquida).

Com base em uma alta concentração de 50  $\mu\text{g}$  BFA/L, migrando a partir de garrafas de PC em fórmula infantil, o potencial de exposição alimentar a partir desta fonte, no percentil 95 de consumo, seria de 8,7  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal/dia. Com base em uma concentração mais típica de 10  $\mu\text{g}$  de BFA/L da fórmula infantil, o potencial de exposição alimentar a partir desta fonte, no percentil 95 de consumo, seria de 1,7  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal/dia. Ambos consideraram o peso estimado de um bebê de três meses. A EFSA também considerou um cenário em que as fórmulas infantis em pó podem ser acondicionadas em latas revestidas internamente com resinas epóxi-fenólico. Kuo e Ding (2004) determinaram o conteúdo de BFA em seis marcas de fórmulas infantis em pó enlatadas disponíveis no mercado na Tailândia. O BFA foi detectado em todas as amostras, em concentrações que variam de 45-113  $\mu\text{g}$  BFA/kg de fórmula. Com base em uma razão de reconstituição de 135 g/L de fórmula líquida e em um valor de concentração de 100  $\mu\text{g}$  de BFA/kg , bebês de 3 meses consumindo 174 mL/ kg de peso

corporal/dia de fórmulas infantis reconstituídas iriam consumir 23 g/kg de peso corporal acima mencionada de fórmulas infantis em pó, levando a uma exposição potencial de até 2,3 µg BFA/kg p.c./ dia.

No geral, o potencial de exposição alimentar em bebês 0-6 meses alimentados a partir de garrafas de PC com fórmulas infantis previamente embalados em latas de alimentos com revestimento de epóxi-fenólica com base em um valor de migração de 50 µg/L de fórmula infantil seria 11 µg BFA/ kg p.c. /dia ( 8,7 + 2,3 µg BFA/ kg p.c./dia). Esta é a estimativa da exposição alimentar em bebês alimentados todos os dias com garrafas PC e presença de BFA na concentração mais elevada observada em condições reais de utilização. Um cenário mais típico, com base em um valor de migração a partir de garrafas de PC de 10 µg/L de fórmula infantil levaria a uma exposição alimentar de 4 µg BFA/kg p.c. /dia (1,7 + 2,3 µg BFA / kg p.c. /dia).

A exposição alimentar potencial em bebês alimentados com fórmulas infantis acondicionadas em mamadeiras de vidro ou mamadeiras de plástico livres de BFA se originaria apenas de fórmulas infantis em pó enlatadas. Dessa forma, a exposição potencial seria até 2,3 µg BFA/kg de peso corporal / dia.

No caso de crianças amamentadas, o BFA no leite humano ocorre como consequência da exposição da mãe através de vias oral e dérmica. Em um estudo realizado por Sun et al. (2004), vinte e três amostras de leite humano de nutrízes saudáveis que vivem no Japão foram analisadas para BFA. O BFA foi detectado em todas as amostras (limite de detecção de 0,11 µg/L ), com valores na faixa de 0,28-0,97 µg/L. O valor médio foi de 0,61 µg/L. Considerando o consumo de 174 mL de leite humano/kg p.c./dia em crianças alimentadas exclusivamente com leite materno, a EFSA estimou a exposição alimentar em 0,1 µg BFA/ kg pc /dia na média e 0,2 µg BFA/ kg pc /dia na maior concentração de BFA observada na literatura. Observou-se que esta

estimativa se baseia em um número limitado de amostras de leite humano coletadas no Japão, podendo não ser representativo da situação na UE.

### ***1.3.1.2. Potencial de exposição alimentar em crianças de 6-12 meses***

O padrão de consumo alimentar de crianças com idades entre 6-12 meses normalmente incluem leite materno, uma série de bebidas fornecidas em mamadeiras (água, suco de frutas, leite) e alimentos homogeneizados que podem ser preparadas tanto em nível doméstico ou adquiridos no mercado.

Mais uma vez a EFSA (2006) estimou a exposição alimentar em crianças com idades entre 6-12 meses, baseando-se no consumo de alimentos infantis comerciais e bebidas disponibilizados no estudo DONALD (KERSTING et al., 1998). O percentil 95 do consumo só foi maior em 6 meses de idade, com um valor de 52 g/kg de p.c. (407 g/dia para um peso médio de 7,8 kg ). Com base em um nível de contaminação de 100 µg BFA/kg, o potencial de exposição a partir de alimentos e bebidas comerciais seria, portanto, de 5,2 µg BFA/kg p.c./dia. Considerando-se que a faixa etária possui uma dieta menos variada do que crianças pequenas ou adultos, somente essa estimativa conservadora de migração do BFA foi utilizada.

Uma potencial fonte adicional de exposição ao BFA são os utensílios e recipientes de PC utilizados para o armazenamento de alimentos. Considerando-se o nível mais alto relatado de BFA em simuladores de alimentos (5 µg BFA/kg) e um consumo de 52 g de alimento/kg p.c., essa fonte de exposição alimentar é potencialmente pequena (0,3 µg BFA/ kg p.c. /dia). Esta fonte de exposição também se aplica a crianças com idades entre 6-12 meses que ingerem preparações domésticas.

Nesta faixa etária, uma exposição adicional ocorre através de fórmulas infantis, e são designadas pela legislação brasileira como de seguimento para lactentes (BRASIL, 2011). De acordo com o estudo DONALD (KERSTING et al., 1998), o maior consumo

nessa faixa etária em relação à massa corporal é de 6 meses de idade, com um valor de 118 mL/kg p.c. obtido de 16 g/kg de peso corporal de fórmulas para um peso médio de 7,8 kg. Com base em um valor de migração conservador de 50 µg BFA/L de mamadeiras de PC para fórmulas infantis, a exposição potencial seria de 5,9 µg BFA/kg p.c./dia. Para um valor de migração típico de 10 µg BFA/L de mamadeiras de PC para fórmula infantil, a exposição potencial seria de 1,2 µg BFA/kg p.c./dia. Um incremento de 1,6 µg BFA/kg p.c. /dia pode ocorrer pelo uso de fórmula em pó acondicionadas em latas revestidas com resinas epóxi-fenólica, e numa migração equivalente a 100 µg BFA /kg de pó.

De uma forma geral, na faixa etária de 6-12 meses, o pior cenário de exposição alimentar é a de um bebê pesando 7,8 kg, ingerindo comida comercial para bebês em níveis elevados de BFA, utilizando recipientes de PC e fórmulas infantis acondicionadas em mamadeiras de PC com a maior migração de BFA já observada em condições reais de utilização. A ingestão total de BFA neste cenário seria 13 µg BFA/kg p.c./dia. Um cenário mais típico apenas para a fórmula infantil , com base num valor de migração de 10 µg/L levaria a uma exposição dietética total de 8,3 µg BFA/kg p.c / dia.

### ***1.3.1.3. Potencial de exposição alimentar em crianças pequenas***

Para aplicações de resinas epóxi-fenólicas em contato com alimentos (alimentos e bebidas enlatados), uma estimativa conservadora de exposição alimentar foi obtida, com base em valores de 50 µg BFA/kg de alimento sólido e 10 µg BFA/L de bebidas. Com uma média de peso corporal de 11 kg para uma criança com idade 1,5 anos (CE, 1993) e de consumo de 2 kg de produtos enlatados (um terço de alimentos sólidos, dois terços de bebidas), a estimativa conservadora de exposição alimentar foi de 4,4 µg BFA/kg de peso corporal .

O potencial estimado de exposição alimentar a partir de recipientes e utensílios de PC foi de 10 µg BFA/dia, obtida do consumo alimentar de 2 kg/dia contendo 5 µg BFA/kg

de alimento. Isso resulta numa exposição potencial de 0,9 µg/kg p.c. para uma criança pesando 11 kg.

Assim, uma estimativa conservadora de exposição ao BFA para crianças pequenas que consomem uma grande variedade de produtos enlatados seria 5,3 µg/kg p.c. /dia (4,4 µg/ kg p.c. /dia a partir de alimentos e bebidas enlatados, além de 0,9 µg/kg p.c /dia a partir de recipientes e utensílios de PC destinados a alimentos. Esta estimativa de exposição é baseada no pressuposto de que todos os alimentos e bebidas são produtos enlatados e utiliza-se utensílios de PC para seu manuseio.

#### **1.3.1.4 Potencial de exposição alimentar em adultos**

Nessa faixa etária, o cenário de exposição considerado baseou-se no pressuposto de que 1 kg de alimento enlatado e 2 litros de bebidas enlatadas são consumidos por dia por um adulto de 60 kg, com valores de 50 µg BFA/kg de alimentos sólidos e 10 µg BFA/kg para bebidas.. Isso deu uma estimativa conservadora de exposição potencial para adultos de 1,2 µg BFA / kg p.c. /dia.

Outra fonte potencial de exposição ao BFA é a migração dos recipientes e utensílios de PC. Uma exposição dietética potencial de 15 µg BFA/dia , ou seja, 0,25 µg BFA/kg p.c./dia oriunda de uma suposição de que há uma migração de 5 µg BFA/kg de alimento ou bebida .

O potencial de exposição alimentar total na população adulta seria 1,45 µg BFA/ kg p.c. /dia.

#### **1.3.2. Estimativas de exposição dietética em diferentes faixas etárias segundo o *National Toxicology Program (NTP, 2008)***

Assim como a EFSA, a NTP (tabela 1) adotou dois cenários para estimar o potencial de exposição dietética ao BFA: um típico, mais próximo a realidade e outro

conservador, pior cenário. Para as estimativas de exposição dietética típica, alguns dados e suposições obtidos de trabalhos científicos no âmbito dos Estados Unidos, Japão e Nova Zelândia foram utilizados, como concentrações de BFA no mercado interno, peso estimado por faixa etária e consumo alimentar da população local. No que diz respeito a exposição dietética num cenário conservador, os valores sugeridos foram equivalentes às projeções estabelecidas pela EFSA (2006).

Tabela 1 – Estimativas de exposição dietética da população segundo NTP, 2008

Faixa etária	Fonte de exposição	BFA (µg/kg p.c./ dia) (Min/Máx)	Referências
0-6 meses	Leite humano <sup>1</sup>	0,2*/1	CHAPIN <i>et al.</i> , 2007; EFSA, 2006
0-6 meses	Leite humano <sup>1</sup> Fórmula Infantil (enlatada) <sup>1</sup> Mamadeiras de PC <sup>1</sup>	1/11*	CHAPIN <i>et al.</i> , 2007; EFSA, 2006
6-12meses	Fórmula infantil (enlatada) <sup>1</sup> Mamadeiras de PC Alimentos e bebidas com revestimentos de resina epóxi <sup>1</sup> Recipientes de PC	1,65/13*	EFSA, 2006; FDA, 2008
Crianças 1,5 – 6 anos	Alimentos e bebidas com revestimentos de resina epóxi <sup>1</sup> Recipientes de PC <sup>1</sup> Alimentos e bebidas diários, ar, poeira, solo <sup>1</sup>	0,0043/14,7	WILSON <i>et al.</i> , 2003; MIYAMOTO;KOTAKE, 2006; WILSON <i>et al.</i> , 2007; EFSA, 2006
Adultos	Alimentos e bebidas com revestimentos de resina epóxi <sup>1</sup> Recipientes de PC	0,008/1,5*	THOMSON;GROUNDS, 2005; EFSA, 2006; MIYAMOTO;KOTAKE, 2006; FDA, 2008;

Notas: (\*) Valores estabelecidos pela EFSA, 2006.

(1)Fontes de exposição utilizadas para os cálculos do NTP, 2008.

Em amplo estudo desenvolvido por Cao e colaboradores, em 2008, os valores de ingestão dietética para o BFA foram inferiores às estimativas do NTP e da EFSA. Para a obtenção das estimativas foram utilizados dados de consumo alimentar, em 24h, isolados

por sexo e idade, pertencentes a conceituada Avaliação/Pesquisa de Nutrição do Canadá, confrontados com a quantidade de BFA presentes em diversos alimentos daquele país. Provavelmente, isso originou estimativas de exposição dietética mais próximas da realidade local. Nas faixas etárias de 0-6 e 6-12 meses que compreendem o grupo de lactentes, as exposições ao BFA contemplaram valores próximos a 0,28 e 0,19 µg/kg p.c./dia, portanto, inferiores aos mensurados pelas instituições já mencionadas (CAO et al., 2008).

Incertezas nas avaliações da exposição alimentar são relacionadas com a ausência de dados que permitam a quantificação da exposição ao BFA relacionadas a algumas fontes. Em todos os grupos da população, a exposição potencial de BFA presente na água potável, em razão do contato com dutos ou tanques de armazenamento, não pode ser quantificado. O mesmo é aplicável ao possível aumento da exposição ao BFA devido à utilização de recipientes aquecidos em forno de micro-ondas. Por outro lado, os pressupostos conservadores da concentração de BFA e de consumo de alimentos e bebidas foram feitos sobre as fontes potenciais de exposição. Estes foram somados, levando a uma avaliação global da exposição fundamentada no conservadorismo e outras na proximidade com a realidade.

#### **1.4. Estudos toxicológicos a partir de baixas doses de BFA**

Há muito tempo, a possibilidade de migração do BFA para alimentos e bebidas vem preocupando pesquisadores. A partir de meados dos anos 90, o problema adquiriu nova dimensão, pois a presença em pequenas quantidades de BFA no organismo humano foi continuamente associada à ocorrência de efeitos adversos. Desde então, vários estudos foram conduzidos tentando elucidar os diversos aspectos e impactos relacionados a baixas doses de BFA. De uma forma geral, consideram-se “baixas doses” aquelas inferiores a dose onde não se observa efeito adverso (*No-Observed Adverse Effect Level* - NOAEL) de 5,0 mg/kg de peso corpóreo (p.c.) /dia (EFSA, 2006; FDA,

2008) determinado através de estudos de toxicidade reprodutiva de multi-gerações em roedores e utilizado para a definição do valor de ingestão diária tolerada (IDT) de 50 µg/kg p.c. /dia (EFSA, 2006). Recentemente, tal valor foi reduzido para 4 µg/kg p.c. /dia (EFSA, 2015).

Trabalhos sobre a exposição humana ao BFA são raros. O primeiro grande estudo sobre os efeitos em seres humanos associados ao BFA foi publicado por Lang e colaboradores, em 2008. Nesse estudo transversal, 1.500 pessoas foram avaliadas em relação a exposição ao BFA, sendo quantificados os níveis da substância na urina. Os autores relataram que níveis elevados de BFA implicaram significativamente em doenças cardíacas, diabetes e níveis elevados de certas enzimas hepáticas. Em 2013, Volberg e colaboradores avaliaram as concentrações urinárias de BFA durante a gestação em dois momentos (semanas 12 e 26) e investigaram os níveis plasmáticos de hormônios (adiponectinas e leptinas), dessas crianças aos nove anos de idade expostas durante a gestação. Os meninos apresentaram aumento dos níveis de leptina, enquanto meninas nos níveis de adiponectina. Os autores sugerem que concentrações urinárias de BFA durante o período gestacional pode influenciar nos níveis de adipocitocinas (adiponectinas e leptinas) em crianças de nove anos de idade.

Embora haja uma limitação sobre as evidências epidemiológicas, o BFA é considerado um desregulador endócrino (EFSA, 2006). Há disponíveis na literatura científica estudos acerca dos possíveis efeitos toxicológicos *in vitro* e *in vivo* do BFA em baixas doses. Embora os mecanismos de ação ainda não tenham sido elucidados, os efeitos relacionam-se, em sua maioria, ao papel ou função estrogênica do BFA nos vários tecidos.

Alguns modelos *in vitro* frequentemente relatam que o BFA teria a capacidade de mimetizar, estimular ou inibir a atividade de estrogênio endógeno e/ou alterar a ação do receptor nuclear do hormônio (receptores de estrogênio - RE $\alpha$  e RE $\beta$ ), e inclusive,



promover efeitos sobre os sistemas de regulação de andrógenos. O efeito anti-androgênico demonstrado pelo BFA está relacionado a capacidade de ligar-se ao receptor androgênico (RA), competindo com andrógenos endógenos como a 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona (DHT), e modular a interação do RA com seu co-regulador ASC1. Outros efeitos incluem, a alteração da função do hormônio tireoidiano, bem como, sobre o desenvolvimento, diferenciação e função do sistema nervoso central e sobre o sistema imunológico (KLINGE, 2000; LEE et al., 2003; WETHERIL et al., 2007). O BFA possui ação antagonista nos receptores de hormônio tireoidiano com afinidade quatro a cinco vezes menor que o hormônio endógeno triiodotironina (MORIYAMA et al., 2002).

O BFA também foi avaliado *in vitro* por ensaios padrões para mutagenicidade/genotoxicidade incluindo os testes de Ames, de indução de trocas entre cromátides-irmãs, de aberrações cromossômicas em células L5178Y de linfoma de camundongo e de mutação gênica em células de mamífero (V79/HPRT). A maioria dos testes indicou que o BFA não é mutagênico (KERI et al., 2007). No entanto, alguns estudos sugeriram que o BFA pode induzir mutações pontuais, quebra de dupla fita de DNA e aneuploidia (TSUTSUI et al., 2000; TAKAHASHI et al., 2001; ISO et al., 2006; LEE et al., 2013). Tsutsui e colaboradores (2000) mostraram que BFA e três outros bisfenóis (BF-3, BF-4 e BF-5) induziram transformação celular e aneuploidia em células embrionárias de hamster sírio (SHE). A aneuploidia é, inclusive, a alteração genética mais comum no câncer. O trabalho de Lee e colaboradores (2013) demonstrou, inclusive, que possíveis alternativas ao uso do BFA, como bisfenol AP, bisfenol M ou bisfenol P apresentaram potencial genotóxico mais acentuado do que BFA evidenciado pelo aumento da indução de quebras de dupla fita de DNA e de aberrações cromossômicas em células DT40. Outros estudos *in vitro* sugerem que o BFA pode promover o crescimento de células de neuroblastoma humano (SK-N-SH); a invasão e metástase de células de neuroblastoma através da expressão e supressão de genes SK-N-SH em

humanos; aumento da expressão gênica de RA presentes no mesênquima da próstata, diretamente envolvidos no crescimento celular; além de transformação neoplásica em células epiteliais mamárias humanas (RICHTER et al., 2007; FERNANDEZ; RUSSO, 2009; ZHU et al., 2009; ZHU et al., 2010). Outro recente estudo *in vitro* avaliou o efeito do BFA ( $10^{-5}$  M) sobre células cancerígenas humanas de ovário (BG-1) e apresentou resultados similares aqueles já mencionados. Assim, as células BG-1 tratadas pelo BFA mostraram significativo aumento de crescimento (dez experimentaram acelerado crescimento, além do aumento da expressão de receptores de estrogênio  $\alpha$  (RE $\alpha$ ) (KANG et al., 2013). Assim como o 17 $\alpha$  estradiol, o BFA já é, inclusive, utilizado em ensaios *in vitro* como substância positiva ou indutora para crescimento de células cancerígenas do ovário (HWANG et al., 2013).

*In vivo*, os efeitos a baixas doses de BFA concentram-se em estudos sobre desregulação endócrina e seus inúmeros desdobramentos no comportamento, bem como sobre reprodução e desenvolvimento. Nos últimos anos, a desregulação endócrina tem recebido atenção e despertado o interesse do meio científico. Em geral, os desreguladores endócrinos atuam mimetizando ou inibindo a ação natural de um hormônio no sistema endócrino ou órgão alvo, interferindo na síntese, secreção, transporte ou na interação hormônio-receptor nas células alvo (CHANG et al., 2009) como agonistas ou antagonistas, resultando em estímulo, redução e/ou bloqueio destes processos (MATTHIESSEN; JOHNSON, 2007). Por exemplo, substâncias com atividades estrogênicas podem intensificar as contrações da musculatura uterina, pela indução de receptores para ocitocina e de receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  no músculo uterino (BORON; BOULPAEP, 2003; LÜLMANN et al., 2008). A maioria dos estudos de desregulação endócrina utilizam ratos e camundongos expostos durante a gestação, período pós-natal, puberdade e vida adulta ao BFA. Estudos sobre o desenvolvimento são apresentados na Tabela 2, sendo que alguns reforçam resultados e mecanismos de

ação encontrados nos ensaios *in vitro*. Importante frisar que existem poucos métodos validados com a finalidade de avaliar os efeitos da ação de substâncias suspeitas sobre o sistema endócrino ou ainda compreender os mecanismos de ação envolvidos nestes efeitos endócrinos. Precisamente, no âmbito da OECD, existem apenas três métodos: um ensaio *in vivo*, o bioensaio uterotrófico (OECD, 2007) e dois *in vitro*, (OECD, 2012a; OECD, 2012b).

Tabela 2 - Estudos em animais expostos a baixas doses de BFA, administrados por via oral, durante o desenvolvimento

<b>Área de estudo</b>	<b>Espécies</b>	<b>Doses µg/kg p.c./dia</b>	<b>Efeitos adversos significativos</b>	<b>Referência</b>
Receptores hormonais cerebrais	Ratos Sprague Dawley (M,F)	40	DPN 37: Aumento de receptores RE $\alpha$ neuronais nos núcleos hipotalâmicos arqueado e ventromedial	CECCARELLI <i>et al.</i> , 2007
	Camundongos ICR CD1 (M,F)	2,0	Aumento da expressão de RNAm para RE $\alpha$ e RE $\beta$ no núcleo dorsal da rafe	KAWAI <i>et al.</i> , 2007
	Ratos Sprague Dawley (M,F)	400	Alterações nos receptores de somatostatina no cérebro da prole	FACCIOLO <i>et al.</i> , 2002
Eixo hipotálamo-hipófise-gônadas	Ratos Sprague Dawley (F)	100; 1200	A prole apresentou desregulação, prolongamento do ciclo estral e redução da hipersecreção de HL na ovariectomia.	RUBIN <i>et al.</i> , 2001; TALSNESS <i>et al.</i> , 2000
	Camundongos (M)	2,4	Redução dos níveis de HL e testosterona sérica	AKINGBEMI <i>et al.</i> , 2004
Eixo hipotálamo-hipófise-tireóide	Ratos Sprague Dawley (M,F)	1,0;10;50	- Elevação do T4 sérico; - Aumento de expressão do gene RC3 (neurogranina) em resposta ao hormônio tireoidiano; - BFA atua como antagonista ao RT $\beta$	ZOELLER <i>et al.</i> , 2005

			(feedback negativo sobre a hipófise)	
Estrutura do cérebro	Ratos Wistar (M,F)	30; 300;1500	Eliminação do dimorfismo sexual e alteração no tamanho do locus ceruleus	<i>KUBO et al., 2003a;</i> <i>KUBO et al., 2003b</i>
Comportamento	Ratos Sprague Dawley (M)	40	Aumento da agressão defensiva e prejuízo no tempo de acasalamento, com redução de desempenho no acasalamento (latência, frequência de interrupção)	<i>FARABOLLINI et al., 2002</i>
	Ratos Sprague Dawley (M,F)	40	Maior reatividade a dor e ao medo provocado	<i>ALOISI et al., 2002</i>
	Camundongos C57B16 (F)	200	Puberdade precoce e comportamento ansioso durante a vida adulta	<i>RYAN e VANDERBERGH, 2006</i>
	Ratos F344N	100	Prejuízo ao aprendizado de tarefas de evasão passiva e ativa	<i>NEGISHI et al., 2004</i>
	Camundongos CD-1 e Ratos (F)	10	Redução ou supressão do comportamento maternal a partir da exposição durante gestação, lactação e na fase adulta	<i>PALANZA et al., 2002</i> <i>DELLA SETA et al., 2005</i>
	Ratos Sprague Dawley (M,F)	40	Alteração no comportamento sócio-sexual em ambos os sexos.	<i>DESSI-FULGHERI et al., 2002</i>
	Camundongos CD-1 (F)	10	Perda da resposta a mecanismos de recompensa estimulados normalmente por anfetamina	<i>IABIOLA et al., 2005</i>

	Ratos Wistar (M) pré-coito	50	Déficit de memória espacial da prole (F1), tanto na aquisição quanto retenção Redução da diferenciação sexual no hipocampo Aumento da suscetibilidade ao estresse (F1 fêmeas)	<i>FAN et al., 2013</i>
Sistema Reprodutivo Feminino	Camundongos CF-1 (F)	2,4	Maturação sexual prematura em fêmeas da prole	<i>HOWDESHELL et al., 1999</i>
	Ratos Sprague Dawley (F)	50; 100	Redução na expressão gênica do receptor RE $\beta$ no útero durante o estro	<i>SCHONFELDER et al., 2004</i>
	Ratos Sprague Dawley (F)	100; 50000	Mudanças na morfologia vaginal durante a fase de estro	<i>SCHONFELDER et al., 2002</i>
	Camundongos C57BL6 (F)	20; 40; 100	Elevação de aneuploidia	<i>HUNT et al., 2003</i>
Sistema Reprodutivo Masculino	Ratos Long Evans (M)	2,4	Redução dos níveis de testosterona testicular (menor capacidade esteroidogênica das céls Leydig)	<i>AKINGBEMI et al., 2004</i>
	Camundongos CD-1 (M)	2,0	Diminuição da testosterona sérica	<i>KAWAI et al., 2003</i>
	Camundongos CD-1 (M)	2; 20; 50	Aumento do tamanho da próstata	<i>GUPTA, 2000; NAGEL et al., 1997</i>
	Camundongos CD-1 (M)	10	Elevação do n° de dutos prostáticos primários e proliferação de céls basais progenitoras de câncer	<i>TIMMS et al., 2005</i>
	Camundongos CF-1 (M)	2,0; 20	- Dose de 2,0: redução do peso do epidídimo e vesículas seminais - Dose de 20: Aumento do peso da próstata e redução da produção diária de esperma/grama de testículo	<i>VOM SAAL et al., 1998</i>
	Ratos Sprague Dawley (M)	1,0	Elevação dos níveis da proteína Hsp90 associada ao RE	<i>WANG et al., 2004</i>

	Ratos Sprague Dawley (M)	100; 50000	Aumento do peso testicular e do n° de céls Sertoli	<i>WISTUBA et al., 2003</i>
Sistema Imunológico	Camundongos DBA/1J (M,F)	30; 300	- Dose de 30: Machos adultos apresentaram elevação da IgG Za - Dose de 300: Elevação de citocinas pela ativação de linfócitos T helper (Th1 e Th2)	<i>YOSHINO et al., 2004</i>

Legenda: M (machos); F (fêmeas); RE (receptor de estrogênio); RT (receptor tireoidiano); DPN (dias pós-natal); p.c.: (peso corpóreo); HL (hormônio luteinizante); céls (células). T4(tiroxina); Hsp90 (Proteínas de choque térmico 90)

Embora existam inúmeros estudos em roedores acerca da toxicologia do BFA em baixas doses, deve-se ter prudência sobre a relevância dos resultados e sua extrapolação para a avaliação de risco em humanos. Isso porque existem diferenças na metabolismo de eliminação do BFA entre espécies. Em seres humanos e outros primatas, o BFA administrado por via oral é rapidamente transformado em BFA-glicuronídeo durante o metabolismo de primeira passagem na parede do intestino e do fígado. A BFA-glicuronídeo formado, que é desprovido de atividade endócrina, é rapidamente excretada na urina, com uma meia-vida de eliminação inferior a 6 horas. Assim, existe baixa biodisponibilidade oral do BFA em seres humanos e outros primatas. Devido a biotransformação e excreção rápidas, o pico de concentração após exposições dietéticas para BFA é estimado como muito baixo, mesmo nos piores cenários de exposição. Os ratos administrados com BFA por via oral sofrem glucuronidação predominantemente, mas o BFA-glicuronídeo formado é excretado a partir do fígado na biliar para o intestino. No intestino, BFA-glicuronídeo é então clivada em BFA e ácido glicurônico e o BFA é reabsorvido para a corrente sanguínea. A recirculação entero-hepática resulta numa eliminação lenta em roedores. Enquanto a glucuronidação do BFA parece ser a principal via de biotransformação do BFA em ratos, a presença de produtos de oxidação de metabólitos do BFA em camundongos, após a administração de baixas

doses, sugere a possibilidade de formação de metabólitos de maior potência estrogênica (EFSA, 2006). O fato é que existem, para membros do meio científico e autoridades, inúmeras incongruências e lacunas acerca da atividade e dos mecanismos de ação do BFA; além de divergências quanto à robustez de alguns resultados. Com vistas aos devidos esclarecimentos, cabe a comunidade científica realizar estudos e gerar resultados toxicológicos de confiabilidade adequada.

### **1.5. O caso BFA e a repercussão internacional**

Diante da repercussão internacional do caso BFA, as autoridades governamentais competentes, a sociedade e a indústria a nível mundial tomaram decisões de formas distintas. Alguns países como Austrália e Nova Zelândia (FSANZ, 2009), Alemanha (BFR, 2008), Suíça (SFOPH, 2009) e Inglaterra (UKFSA, 2010) consideraram segura a utilização de mamadeiras e latas para alimentos quanto aos níveis de exposição ao BFA e aos limites atualmente praticados. Justificam ainda que o uso apropriado dos referidos itens não acarretaria níveis de exposição dignos de preocupação. Os Estados Unidos da América (EUA), através da *Food and Drug Administration* (FDA), e a Organização Mundial de Saúde (OMS) demonstraram preocupação e incertezas no que se refere aos produtos contendo BFA. E convocaram painéis de especialistas para analisar a questão e, nesse contexto, produziram um relatório sobre a segurança do BFA (NIEHS, 2008; OMS, 2009). Em setembro de 2009, a *U.S. Environmental Protection Agency* (EPA) demonstrou “alguma preocupação” com o BFA e desenvolveu um plano de ação (EPA, 2010). Em outubro, o *U. S. National Institute of Health* (NIH) anunciou o investimento de U\$30.000.000 em bolsas para estimular o estudo dos efeitos sanitários do BFA (SAREWITZ, 2009). A revista *Consumer Reports* publicou uma análise sobre a quantidade de BFA em alguns alimentos enlatados e bebidas, onde em casos específicos, o conteúdo de uma única lata de alimento poderia exceder o limite atual de ingestão diária de exposição cumulativa proposta pela *Food and Drugs Administration*

(CONSUMERS UNION, 2009). Seria esperado que medidas governamentais proibitivas ou restritivas e a enorme exposição na mídia do BFA e seus possíveis efeitos adversos, provocariam reações negativas e positivas da parte teoricamente mais prejudicada, ou seja, a indústria americana. Em maio de 2009, o "Washington Post" acusou os fabricantes de recipientes para alimentos e bebidas e alguns de seus maiores clientes de tentar elaborar um *lobby* como estratégia para bloquear as proibições do governo ao BFA (LAYTON, 2009). Depois, o "The Milwaukee Journal Sentinel", como parte de uma série de investigações sobre o BFA e seus efeitos, revelou os planos da Sociedade da Indústria do Plástico para executar uma grande "blitz" em relações públicas para promover o BFA, incluindo planos para atacar e desacreditar aqueles que se reportam ou comentam negativamente sobre o monômero e seus efeitos (KISSINGER; RUST, 2009; RUST; KISSINGER, 2009). Algumas indústrias preferiram reagir preventivamente. As seis maiores empresas norte-americanas que comercializavam mamadeiras decidiram interromper o uso de BFA em seus produtos (LAYTON, 2008).

Outros países como Canadá, França e Dinamarca seguiram um caminho semelhante ao adotado por alguns estados e municípios nos EUA. O Canadá proibiu a importação, venda e propaganda de mamadeiras de policarbonato contendo BFA devido a preocupações de segurança, além de investigar formas de reduzir a contaminação do BFA em fórmulas infantis em latas de metal (GOVERNMENT OF CANADA, 2008). No início de 2010, o ministro da Saúde dinamarquês proibiu temporariamente a utilização de BFA em qualquer produto e o Senado Francês aprovou projeto de lei para suspensão da comercialização de mamadeiras (GERLACH, 2010; LEMONDE, 2010). A União européia e o Brasil proibiram a importação e comercialização de mamadeiras que contenham BFA em sua composição (UE, 2011a; BRASIL, 2011).



## **1.6. Justificativa**

Nos últimos anos, a possibilidade de ocorrência de efeitos adversos relacionados a baixas doses de BFA tem recebido destaque da imprensa mundial e despertado a preocupação de especialistas, autoridades e da população. As discussões e controvérsias não cessam; versões, interpretações surgem a todo tempo. Em razão da quantidade de trabalhos científicos que associam baixas doses de BFA a uma diversidade de efeitos adversos, parece haver uma sinalização de que os valores de IDT para o BFA deverão ser revistos.

Dessa forma, não há como desconsiderar a questão. No que diz respeito à saúde pública, é preciso identificar as possíveis fontes de exposição ao BFA, mensurar suas concentrações nas diferentes matrizes e, conseqüentemente, avaliar o risco e o nível de exposição da população brasileira à substância, particularmente, de lactentes pois apresentam maior suscetibilidade a efeitos adversos em decorrência da imaturidade de seu organismo.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo Geral**

- Determinar os níveis de BFA em fórmulas infantis e sua parcela de contribuição na exposição de lactentes

### **2.2. Objetivos específicos**

- Desenvolver e validar método analítico para identificação e quantificação de BFA em fórmulas infantis;
- Estimar Incerteza de Medição do método analítico desenvolvido;
- Mensurar as concentrações de BFA em sessenta fórmulas infantis destinadas a lactentes e adquiridas de mercados locais;
- Estimar parcela de contribuição de fórmulas infantis sobre o nível de exposição ao BFA, via oral, de lactentes;
- Propor novo método, alternativo ao bioensaio uterotrófico, para avaliação de estrogenicidade de substâncias administradas por via oral;

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Método analítico

##### 3.1.1. Material

- Acetona para cromatografia líquida de alta eficiência com pureza >99%
- N-Heptano para cromatografia líquida de alta eficiência com pureza >99%
- Acetonitrila para cromatografia líquida de alta eficiência com pureza >99%
- Hexano para cromatografia líquida de alta eficiência com pureza >99%
- Metanol para cromatografia líquida de alta eficiência com pureza >99%
- Espatula
- Becher 250 mL
- Pipeta graduada 15 mL
- Tubos Falcon PP 15 mL
- Tubos Falcon PP 50 mL
- Pipeta volumétrica 15 mL
- Pipeta volumétrica 5 mL
- Pipeta volumétrica 10 mL
- Pipeta volumétrica de 20 mL
- Pipetador automático
- Balão volumétrico 500 mL
- Balão volumétrico 100 mL
- Cartucho SPE Florisil 500 mg 3 mL
- Acessórios para manifold (válvulas e reservatório 30 mL)
- Tubos de ensaio vidro c/ rosca 13x100 mm
- Rack tubo de ensaio
- Ponteiras
- Becher 50 mL
- Becher 250 mL.
- Água deionizada e filtrada em disco Envy100 (Millipore®)
- Disco/Filtro Envy 100
- Naveta pequena
- Balão volumétrico 10 mL
- Ponteiras 100-1000 µL
- Ponteiras 500-5000 µL
- Becher 50 mL

- Becher 250 mL
- Microseringa de vidro
- Filtro 0,45  $\mu\text{m}$  para solvente orgânico

### 3.1.2. Equipamentos

- Refrigerador para amostras;
- Refrigerador para soluções e reagentes;
- Micropipetas automáticas e calibradas de volume variável de 10 a 100, 100-1000 e 500-5000  $\mu\text{L}$  (Eppendorf);
- Balança analítica Sartorius modelo R200D com resolução de 0,1 mg;
- Balança analítica Shimadzu com resolução de 0,1 mg;
- Manifold para extração em fase sólida com 20 posições
- Evaporador Percking Helmer/Vap III
- Bomba a vácuo
- Saída de  $\text{N}_2$
- Ultrassom
- Centrífuga Eppendorf modelo 5804r, com refrigeração e capacidade para 10000 rpm (15 mL)
- Liofilizador Liotop modelo K105
- Pipetador automático
- Termômetro digital VWR com variação de  $-50^\circ\text{C}$  a  $70^\circ\text{C}$  calibrado
- Capela de exaustão
- Estufa
- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência Merck-Hitachi, modelo série D-7000, composto por injetor automático, forno para coluna, detector de fluorescência e computador para aquisição e processamento dos dados.

### 3.1.3. Reagentes e Padrões

- Derivatizante DIB-Cl (4-(4,5-difenil-imidazol-2-ila) cloreto de benzoíla)
- Padrão de Bisfenol A com pureza de 99% Sigma-Aldrich;
- Trietilamina para cromatografia de alta eficiência (TEA)
- Solução aquosa de amônia 28-30%
- Solução aquosa de ácido acético glacial 100%
- Etanol com grau de pureza 95%

#### 3.1.4. Soluções

A solução estoque inicial de BFA ( $S_1$ ) com concentração igual a 100 mg/L foi preparada pela dissolução de aproximadamente 10 mg  $\pm$  0,1 do padrão do BFA (99% m/m) para 100 mL de acetonitrila. Em seguida, foram transferidos 1,0 mL dessa solução inicial para um balão volumétrico de 100 mL, obtendo-se assim uma solução de concentração equivalente a 1,0 mg/L ( $S_2$ ). A solução foi acondicionada em frasco de vidro, protegido contra a entrada de luz e armazenada sob refrigeração (6 a 10°C). A degradação pode ocorrer após um mês.

#### 3.1.5. Amostras

Trata-se de fórmulas infantis à base de leite para lactentes, comercializadas em pó e designadas legalmente como de “partida” (0 à 5 meses e 29 dias) e de “seguimento” (6 à 11 meses e 29 dias). Serão analisadas trinta amostras de cada designação ou classificação, sendo as fórmulas de partida provenientes de cinco fabricantes e as de seguimento, de quatro fabricantes. Em paralelo, foram adquiridas mamadeiras constituídas de PC em período anterior a proibição legal de sua comercialização. Serão utilizadas na realização de ensaios de migração com as fórmulas infantis previamente estudadas. As amostras foram identificadas, catalogadas e armazenadas sob refrigeração entre 6 e 10°C, até o momento dos ensaios.

Uma amostra dentre as adquiridas comercialmente apresentou os requisitos necessários para classificá-la como amostra branca (AMB), e foi utilizada para o procedimento de validação analítica. A apresentação dessa amostra distinguiu-se das demais, uma vez que estava acondicionada em sachê.

Além das amostras de fórmula infantil em pó, foram adquiridas dezesseis mamadeiras de policarbonato, outra fonte de exposição ao BFA, de três fabricantes. Apesar da proibição legal de comercialização desse tipo de mamadeiras, as mesmas serão testadas quanto ao potencial de migração de BFA proveniente no frasco de PC para a fórmula infantil reconstituída.

### 3.2. Método para determinação de BFA presentes nas fórmulas infantis em pó

#### 3.2.1. Orientações para proteção individual e coletiva

Utilização de equipamento de proteção individual como óculos, luvas e jaleco; e equipamento de proteção coletiva como capelas de exaustão química durante a condução dos ensaios.

#### 3.2.2. Condicionamento do equipamento, detecção e quantificação

Diariamente, a coluna e a lâmpada de xenon eram submetidas ao procedimento de condicionamento visando assegurar o funcionamento correto e efetivo da mesma. O equipamento permanecia sobre fluxo constante de fase móvel com 90% de acetonitrila e 10% de água e a lâmpada ligada por período de 30 minutos antes de qualquer injeção. A “purga” do sistema era feita diariamente ao ativar o equipamento.

As condições de operação do sistema de CLAE-FL foram as seguintes:

- Coluna Octadecil em fase reversa Lichrospher, Merck, com 4,6 x 250 mm (5,0  $\mu$ m)
- Volume de injeção: 10  $\mu$ L
- Modo de injeção: Loop
- Fase móvel: Acetonitrila 55%/ solução aquosa de acetato de sódio 0,1 M /Metanol 33% (Isocrática)
- Fluxo: 0,4 mL/min
- Temperatura do forno: 35°C
- Emissão: 475nm
- Excitação: 350nm
- Tempo de corrida: 20 min

#### 3.2.3. Método de análise

As amostras, mantidas sob refrigeração, foram retiradas e homogeneizadas por agitação mecânica. Três gramas de cada amostra foram pesadas em tubo Falcon de 50 mL, realizando-se três repetições por amostra. Paralelamente, cada batelada de injeções fora acompanhada de três injeções com brancos da amostra.

### 3.2.3.1. Extração por solventes/centrifugação/evaporação por N<sub>2</sub>

Nessa etapa, a extração do analito de interesse da fração lipídica da amostra, foi efetuada através da adição de solventes como n-hexano e acetonitrila. Inicialmente, transferiu-se 15 mL de n-hexano e submeteu-se ao ultrassom durante 20 minutos. Posteriormente, adicionou-se igual volume de acetonitrila, repetindo a etapa anterior em ultrassom durante 20 minutos. Retirou-se a fase inferior da mistura (com acetonitrila e o BFA) cuidadosamente, sendo o volume de 15 mL acondicionado em tubos Falcon PP de 15 mL. O extrato fora submetido a centrifugação, objetivando a perfeita separação das fases. As condições utilizadas foram 10.000 rpm/15°C durante 30 min. Após a formação de duas fases no extrato, iniciou-se a separação e manutenção apenas da camada inferior. Em seguida, o material foi evaporado até secagem total por fluxo de gás N<sub>2</sub>.

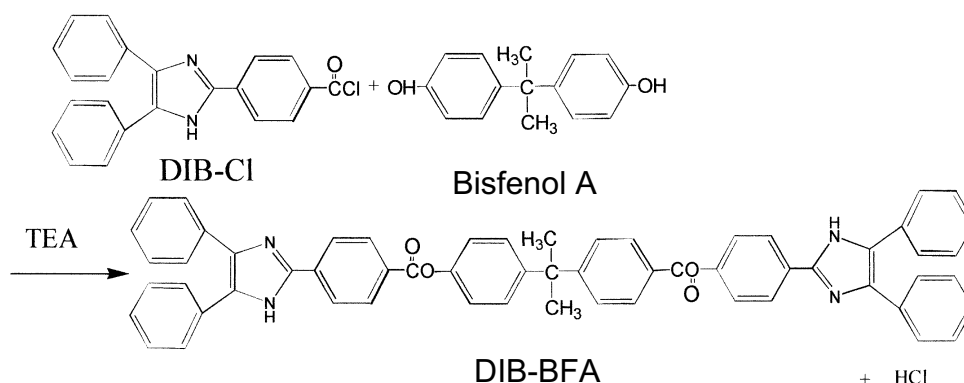
### 3.2.3.2. Ressuspensão/extração em fase sólida

O extrato seco foi ressuspensão em 15 mL de solvente 3:97 v/v acetona:n-heptano e transferido para o reservatório do Manifold Waters com o cartucho SPE Florisil posicionado. Efetuado o posicionamento de todas as amostras no Manifold, o sistema foi ajustado para garantir uma vazão de 2,0 mL/min e a repetibilidade do ensaio. Adicionou-se 10 mL do solvente de lavagem 5:95 v/v acetona:n-heptano e outros 10 mL de solvente para eluição do analito, 20:80 v/v acetona:n-heptano. Em seguida, o material fora evaporado até secagem total com fluxo de N<sub>2</sub> e ressuspensão em 150 µL de acetonitrila. Ao final, o extrato seco foi armazenado em refrigerador a 4 °C, na ausência de luminosidade e umidade, aguardando procedimento de derivatização.

### 3.2.3.3. Derivatização

Retirado previamente o extrato da refrigeração (30 min), a reação ocorreu pela adição de uma alíquota de 150  $\mu\text{L}$  de solução 10 mM de DIB-Cl (1,2% TEA/acetonitrila) ao extrato seco. A solução é extremamente instável, devendo ser imediatamente utilizada. A reação foi paralisada após 20 min em temperatura ambiente pelo acréscimo de 15  $\mu\text{L}$  de solução aquosa 12,5% de amônia. Após 10 minutos de repouso, adicionou-se 15  $\mu\text{L}$  de solução aquosa 5,0% de ácido acético. O produto da derivatização foi filtrado através de uma seringa de vidro com capacidade de 1 mL acoplada a filtro de membrana 0,45  $\mu\text{m}$  e acondicionado em frasco com capacidade de 350  $\mu\text{L}$  para injeção posterior.

Figura 4 – Reação química entre o bisfenol A e derivatizante DIB-Cl  
(Fonte: Watanabe et al., 2001)



### 3.2.3.4. Ensaios de migração com mamadeiras de PC

Dezesseis amostras de fórmulas infantis tanto de partida e quanto de seguimento foram selecionadas e submetidas ao ensaio de migração com as mamadeiras de PC. No ensaio, as fórmulas infantis em pó foram reconstituídas na proporção 1/8 (m/v) em água destilada livre de BFA, conforme indicação do



fabricante. A fórmula permaneceu em contato com as mamadeiras sob temperatura de 100 °C, durante 30 minutos (BRASIL, 2010) e, em seguida, submetida a liofilização. Dispostas em placas de petri, as fórmulas permaneceram a  $\leq -70$  °C / 24h e liofilizadas em 24h.

#### 3.2.4. Caracterização do padrão e qualificação do equipamento

Procedeu-se a qualificação do sistema cromatográfico a partir de testes preconizados pelo fabricante do equipamento e disponibilizados no respectivo manual. O objetivo é garantir que o CLAE-FL apresente condições adequadas de uso. Com a utilização de material de referência certificado, metil-parabeno, realizaram-se ensaios para avaliar aspectos como precisão e exatidão do fluxo; repetibilidade do injetor, linearidade e ruído do detector. Todos os parâmetros encontravam-se dentro de critérios de avaliação estabelecidos.

#### 3.2.5. Validação intralaboratorial

O procedimento para validação intralaboratorial foi basicamente descrito por Souza (2007). A adequação ao propósito do método foi determinada a partir dos resultados de parâmetros como faixa de trabalho, linearidade, efeitos de matriz, seletividade, recuperação, repetibilidade, limites de detecção e quantificação. Salienta-se que a repetibilidade e os limites de detecção e quantificação foram determinados segundo ABNT (2012) e Horwitz; Albert (2006); MILLER; MILLER (1993) e Huber (2003), respectivamente.

##### 3.2.5.1. Faixa de trabalho (FT)

A faixa de trabalho não foi determinada com base no limite de restrição da substância. Como o limite de restrição é relativamente elevado (0,6 mg/kg) e os resultados experimentais disponíveis na literatura apontam para a presença de BFA em níveis de traço, há o entendimento que o trabalho não deve adotar uma faixa de trabalho que não contemplasse às concentrações de BFA esperadas (CARABIAS-MARTÍNEZ et al., 2006; SHAO et al., 2007b; SHAO et al., 2005; MARAGOU et al., 2006). Essa conduta é particularmente importante ao se investigar e avaliar os níveis

de exposição dos lactentes à substância. Portanto, os níveis de trabalho aqui adotados compreenderam o intervalo de 0,5 a 10,5 µg/L da alíquota.

### 3.2.5.2. Linearidade

A linearidade foi realizada através de ensaios com soluções padrão. Foi preparada uma curva analítica  $y = a + bx$ , com níveis de concentração igualmente espaçados 0,5; 2,5; 4,5; 6,5; 8,5; 10,5 µg/L, sendo três repetições independentes de cada nível. Alíquotas de 50, 250, 450, 650, 850, 1050 µL da solução estoque (S<sub>2</sub>) de BFA foram transferidas para balão volumétrico de 100 mL e empregados na confecção da curva analítica. As soluções foram preparadas e analisadas aleatoriamente. Brancos foram preparados a cada corrida, como ferramenta de controle de qualidade.

A linearidade foi avaliada através da estimativa dos parâmetros pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO), inspeção visual dos dados e gráficos e tratamento de valores extremos. O MMQO, que minimiza a soma dos quadrados dos resíduos (erros) da regressão é utilizado para estimar os parâmetros de regressão. Os valores extremos foram tratados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife, o qual foi aplicado consecutivamente até que novos valores extremos não fossem detectados ou até exclusão máxima de 22,2% do número de análises (BELSEY; KUH; WELSCH, 1980; HORWITZ, 1995). O MMQO parte da premissa que os resíduos seguem a distribuição normal, têm variância constante ao longo do eixo x e são independentes. Tais premissas relacionadas à análise de regressão foram avaliadas quanto à normalidade por Ryan e Joiner (1976); homoscedasticidade por Levene (1960) e Brown e Forsythe (1974); e independência dos resíduos da regressão por Durbin e Watson (1951). O teste F foi conduzido para verificar o ajuste ao modelo linear por meio da avaliação da significância da regressão (DRAPER; SMITH, 1998).

#### *Estimativas dos parâmetros pelo MMQO*

Num primeiro momento, há a inspeção visual dos dados e a construção do gráfico das respostas analíticas versus concentrações do analito. Os parâmetros da regressão  $\alpha$  e  $\beta$  são estimadas como  $a$  e  $b$ , respectivamente, correspondentes aos valores que minimizam a soma de quadrados dos resíduos da regressão  $\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2$

sendo  $\hat{y}_i$  o valor estimado de  $Y_i$  para um dado valor de  $X_i$  quando  $a$  e  $b$  são determinados.

As estimativas de inclinação  $b$  e interseção  $a$  da reta ajustada estão demonstradas nas Equações E.1 e E.2, respectivamente.

$$b = \frac{S_{xy}}{S_{xx}} \quad \text{Equação E.1}$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad \text{Equação E.2}$$

sendo

$$S_{xy} = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) = \frac{\sum_{i=1}^n x_i y_i - \sum_{i=1}^n x_i \sum_{i=1}^n y_i}{n}$$

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 = \frac{\sum_{i=1}^n x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n x_i\right)^2}{n}$$

$$\bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^n y_i}{n}$$

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

$x_i$  = concentração conhecida do analito

$y_i$  = resposta medida

$n$  = número de pontos da curva de calibração

Para cada concentração  $x_i$ , no qual uma resposta  $y_i$  está disponível, o resíduo  $e_i$  é dado pela equação E.3

$$e_i = y_i - \hat{y}_i \quad \text{Equação E.3}$$

sendo

$\hat{y}_i$  = variável estimada pela equação de regressão

As variâncias de inclinação  $s_b^2$ , da interseção  $s_a^2$  e dos resíduos da regressão  $s_{res}^2$  são calculadas pelas equações E.4, E.5 e E.6.

$$s_b^2 = \frac{s_{res}^2}{S_{xx}} \quad \text{Equação E.4}$$

$$s_a^2 = s_{res}^2 \frac{\sum_{i=1}^n x_i^2}{nS_{xx}} \quad \text{Equação E.5}$$

$$s_{res}^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2} \quad \text{Equação E.6}$$

O coeficiente de determinação do ajuste  $R^2$  é definido pela equação E.7.

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad \text{Equação E.7}$$

Os valores estimados para a inclinação e interseção, assim como as suas respectivas variâncias, são utilizados para construir a equação a ser utilizada para estimar as concentrações de amostras. Os resíduos da regressão computados são empregados nos testes subseqüentes.

#### *Tratamento de valores extremos*

O gráfico dos resíduos da regressão versus os níveis de concentração é construído. Duas linhas pontilhadas horizontais correspondentes a  $\pm t_{(1-\alpha/2; n-2)} s_{res}$  são utilizadas para indicar uma variabilidade aceitável entre os resíduos de regressão, sendo os pontos fora desses limites entendidos como tendências. Os valores extremos são avaliados pelo método de resíduos padronizados Jackknife, cuja estatística é o resíduo padronizado Jackknife  $J_{ei}$ , calculado para cada ponto da curva analítica e descrito na equação E.8.

$$J_{ei} = r_i \sqrt{\frac{n - p - 1}{n - p - r_i^2}} \quad \text{Equação E.8}$$

sendo

$p$  = número de parâmetros do modelo

$r_i = \frac{e_i}{s_{ei}}$ , resíduo padronizado

$s_{ei} = s_{res} \sqrt{1 - h_i}$ , erro padrão do resíduo

$h_i = \frac{1}{n} + \frac{(x_i - \bar{x})^2}{S_{xx}}$ , leverage

Os resíduos padronizados Jackknife seguem a distribuição de  $t_{(1-\alpha/2; n-p-1)}$ . Valores de  $J_{ei}$  maiores que o valor de  $t$  crítico para o nível de significância 0,05 foram considerados extremos (BELSLEY, KUH e WELSCH, 1980) e removidos até o limite percentual de 22,2% dos dados tratados (HORWITZ, 1995) ou até a última

repetição de um nível de concentração. O MMQO foi recalculado a cada exclusão de valores extremos.

### Teste de normalidade

A normalidade dos resíduos da regressão foi avaliada pelo teste de Ryan-Joiner, que se utiliza do teste de hipóteses para confirmar se os resíduos seguem a distribuição normal e, portanto, os desvios da normalidade não seriam significativos. A estatística do teste é o coeficiente de correlação de Ryan-Joiner  $R$ . A hipótese nula é rejeitada se os coeficientes  $R$  são inferiores aos valores críticos estabelecidos. Os resíduos foram colocados em rol e foi construído um gráfico dos valores dos resíduos *versus* valores percentis estimados para uma distribuição normal reduzida. Um gráfico dos resíduos ordenados de uma amostra ( $e_i$ ) de tamanho  $n$  versus os pontos dos percentis de uma distribuição normal reduzida ( $q_i$ ) foi construído. Os quantis normais foram obtidos pela equação E.9.

$$q_i = \phi^{-1} \left\{ \frac{(i - 3/8)}{(n + 1/4)} \right\}, i = 1, \dots, n \quad \text{Equação E.9}$$

sendo

$q_i$  = valor normal esperado

$\phi^{-1}$  = inverso de uma função de distribuição normal padrão

O coeficiente de correlação entre  $e_i$  e  $q_i$  foi calculado conforme equação E.10

$$R_{eq} = \frac{S_{eq}}{\sqrt{S_{ee} \times S_{qq}}} \quad \text{Equação E.10}$$

sendo

$$S_{eq} = \sum_{i=1}^n (e_i - \bar{e})(q_i - \bar{q}) = \sum_{i=1}^n e_i q_i - \sum_{i=1}^n e_i \sum_{i=1}^n q_i / n$$

$$S_{ee} = \sum_{i=1}^n (e_i - \bar{e})^2 = \sum_{i=1}^n e_i^2 - \left( \sum_{i=1}^n e_i \right)^2 / n$$

$$S_{qq} = \sum_{i=1}^n (q_i - \bar{q})^2 = \sum_{i=1}^n q_i^2 - \left( \sum_{i=1}^n q_i \right)^2 / n$$

$$\bar{e} = \frac{\sum_{i=1}^n e_i}{n}$$

$$\bar{q} = \frac{\sum_{i=1}^n q_i}{n}$$

Se o gráfico obedecer a uma linha reta, os dados seguem uma distribuição normal. Caso contrário, o gráfico apresentará algum grau de curvatura ou distribuição aleatória de dados e os mesmos serão provenientes de uma outra distribuição de probabilidade.

Os coeficientes de correlação críticos para conjunto de dados pertencentes à distribuição normal foram obtidos para o nível de significância igual a 0,05 pela equação E.11 (RYAN e JOINER, 1976). Dessa forma, o resultado gráfico pôde ser confirmado pelo cálculo do coeficiente  $R$ .

$$R_{crit} \approx 1,0063 - \frac{0,1288}{\sqrt{n}} - \frac{0,6118}{n} + \frac{1,3505}{n^2} \quad \text{Equação E.11}$$

#### *Teste de homoscedasticidade das variâncias dos resíduos*

O teste de Levene (LEVENE, 1960) modificado por Brown e Forsythe (1974) foi utilizado para avaliar a homogeneidade das variâncias, a partir da hipótese nula de que as variâncias dos resíduos da regressão não diferem entre si, ou seja, há homoscedasticidade. Para a hipótese alternativa as variâncias dos resíduos seriam diferentes, havendo, no caso, heteroscedasticidade. A estatística do teste é o F de Levene  $F_L$ . No caso em questão, os resíduos foram divididos em dois grupos  $n_1$  e  $n_2$ , para 1 grau de liberdade, em que  $t = \sqrt{F}$ , e calculou-se a estatística t de Levene  $t_L$ . A hipótese nula é descartada quando  $t_L$  for superior ao t crítico  $t_{(1-\alpha/2; n_1+n_2-2)}$ . Os grupos foram distribuídos eqüitativamente, tendo o cuidado para não separar repetições de um mesmo nível em grupos distintos. As medianas dos resíduos de cada grupo  $\tilde{e}_1$  e  $\tilde{e}_2$  foram calculadas e obtidas as diferenças absolutas entre as medianas e os resíduos dos respectivos grupos  $d_{1j} = |\tilde{e}_1 - e_{1j}|$  e  $d_{2j} = |\tilde{e}_2 - e_{2j}|$ . A média das diferenças  $\bar{d}_k$  e a soma dos quadrados dos desvios  $SQD_k$  dos valores  $\bar{d}_{kj}$  de cada grupo  $k = 1$  e  $k = 2$  foram calculadas. O valor de  $t_L$  foi obtido pela equação E.12.

$$t_L = \frac{(\bar{d}_1 - \bar{d}_2)}{\sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right) s_p^2}} \quad \text{Equação E.12}$$

sendo

$\bar{d}_k = \sum |\tilde{e} - e_{kj}| / n_k$ , média dos módulos das diferenças entre o j-ésimo resíduo e a mediana de cada grupo  $k = 1$  e  $k = 2$

$n_k$  = número de observações em cada grupo

$\tilde{e}_k$  = mediana de cada grupo

$s_p^2 = \frac{(SQD_1 + SQD_2)}{(n_1 + n_2 - 2)}$ , variância combinada

$SQD_k = \sum_{j=1}^{n_k} (\tilde{e}_k - e_{kj})^2$ , soma dos quadrados dos desvios entre cada j-ésimo resíduo e a mediana de seu k-ésimo grupo, para cada grupo.

Caso  $t_L$  seja inferior ao valor crítico  $t_{(1-\alpha/2; n_1+n_2-2)}$ , há a indicação de homoscedasticidade, não havendo razões para rejeitar a hipótese nula e acreditar que a variância dos resíduos não seja constante. A significância  $p$  também deve ser superior a 0,05 (LEVENE, 1960; BROWN e FORSYTHE, 1974).

### Teste de independência dos resíduos

A autocorrelação ou independência dos resíduos da regressão é verificada pelo teste de Durbin-Watson, considerando-se a hipótese nula de que não há autocorrelação entre os resíduos, ou seja, são independentes; e a hipótese alternativa de que há autocorrelação entre os resíduos e, portanto, não são independentes. Assumindo-se que os resíduos  $e_i$  são variáveis independentes, a autocorrelação entre os resíduos seria  $\rho_s = 0$  (hipótese nula). Essa hipótese foi testada contra a alternativa em que  $\rho_s = \rho (\rho \neq 0 \text{ e } |\rho| < 1)$ . A estatística de Durbin-Watson é a ferramenta utilizada para a avaliação e está descrita na equação E.13.

$$d = \frac{\sum_{i=2}^n (e_i - e_{i-1})^2}{\sum_{i=1}^n e_i^2} \quad \text{Equação E.13}$$

Para cada grupo de dados, existem dois limites críticos  $d_L$  (inferior) e  $d_U$  (superior). Caso o valor de  $d$  esteja entre esses limites, o teste é inconclusivo. Valores de  $d < d_L$  indicam autocorrelação e a hipótese nula é rejeitada para um nível de significância de  $2\alpha$ ; enquanto valores de  $d > d_U$  indicam independência e a não rejeição da hipótese nula. O valor de  $d$  varia de zero a quatro. Se o valor converge para dois significa que não há autocorrelação e os resíduos são independentes. No mesmo sentido, se os valores se afastam de dois para zero ou quatro, então, a autocorrelação aumenta. Geralmente, valores entre 1,5 e 2,5 podem ser utilizados como ponto de corte inferior e superior (DURBIN e WATSON, 1951). Os valores limites de  $d$  são estimados pelas equações E.14 e E.15 para nível de significância igual a 0,05.

$$d_L \approx 1,9693 - \frac{2,8607}{\sqrt{n}} - \frac{3,4148}{n} + \frac{16,6400}{n^2} \quad \text{Equação E.14}$$

$$d_U \approx 1,9832 - \frac{3,0547}{\sqrt{n}} - \frac{1,3862}{n} + \frac{16,3662}{n^2} \quad \text{Equação E.15}$$

#### *Teste de significância da regressão*

Para a realização do teste, a variabilidade total das respostas é dividida em soma do quadrado dos resíduos da regressão (em torno da regressão) e soma dos quadrados devido à regressão. A soma de quadrados dos resíduos da regressão é separada em soma dos quadrados do desvio da linearidade (falta de ajuste ao modelo) e soma dos quadrados do erro puro. A segmentação da variabilidade total das respostas, em soma de quadrados entre níveis e soma de quadrados do erro puro (dentro dos níveis), também foi feita para auxiliar os cálculos.

A tabela de análise de variância para o teste é construída a partir das equações dispostas na tabela 3. A estatística do teste é a razão entre as variâncias, que segue a distribuição de  $F$  com os graus de liberdades correspondentes.



**Tabela 3 - Análise de variância para significância da regressão ( $\alpha=0,05$ )**

<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>
Regressão	1	$\frac{\left[ \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) \right]^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$	$\frac{SQ_{regr}}{GL_{regr}}$	$\frac{QM_{regr}}{S_{res}^2}$
Resíduos	$n - 2$	$\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2$	$\frac{SQ_{res}}{GL_{res}} = S_{res}^2$	
Total	$n - 1$	$\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2$	$\frac{SQ_{Total}}{GL_{Total}}$	

$\bar{FV}$  = fonte de variação,  $GL$  = grau de liberdade,  $SQ$  = soma dos quadrados,  $QM$  = quadrado médio,  $F$  = razão entre variâncias,  $n$  = número de  $i$  pontos de curva analítica,  $u$  = número de níveis de concentração,  $n_k$  = número de pontos  $j$  em cada nível de concentração  $k$ ,  $y_i$  = resposta medida,  $x_i$  concentração conhecida do analito,  $\hat{y}_i$  = variável dependente estimada pela equação de regressão,  $\bar{y}$  = média das respostas medidas,  $\bar{x}$  = média das concentrações conhecidas,  $\bar{y}_k$  = média de respostas medidas do  $k$ -ésimo nível de concentração.

Para avaliação da regressão, é testada a hipótese nula de que a regressão linear não é significativa (ou seja, a variação dos valores de  $y_i$  não é explicada pela regressão) e a hipótese alternativa de que a regressão linear é significativa (variação dos valores de  $y_i$  é explicada pela regressão). A hipótese nula é rejeitada se o valor de  $F$  for maior que o valor crítico  $F_{(1-\alpha;1;n-2)}$ . A significância da distribuição  $F(p)$  também deve ser analisada. Para a regressão linear dos resíduos,  $p$  deve ser inferior a 0,001.

### 3.2.5.3. Efeito Matriz

A avaliação do efeito de matriz proposta por Souza (2007) sugere a confecção de duas curvas do analito: uma, denominada de solvente, originada a partir de soluções com padrão; e outra, denominada de matriz, originada de amostras.

A curva e as soluções do analito em solvente foram aquelas já utilizadas para a avaliação da linearidade. No item anterior, foram descritos todos os testes aos quais se submeteram os dados.

A curva da matriz foi checada pelo método de adição. Soluções de adição foram preparadas nos níveis de 0,5; 2,5; 4,5; 6,5; 8,5; 10,5  $\mu\text{g/L}$ , sendo três

repetições independentes de cada nível. O método proposto por Souza (2007) sugere a utilização de amostra branca ou material de referência certificado (MRC). As soluções foram adicionadas a uma amostra branca denominada AMB, confirmada pela realização de dez ensaios independentes.

As respostas (áreas) foram então utilizados em todo tratamento estatístico e na confecção da curva analítica da matriz. O preparo e análise das curvas do analito em solvente e na matriz foram realizados sob condições emparelhadas.

Os dados experimentais obtidos para as curvas do analito em solvente e matriz foram analisados pelo MMQO, e pelas premissas descritas no item 3.8.2. Satisfeitas as premissas, a próxima etapa foi avaliar a homogeneidade das variâncias dos resíduos da regressão. A hipótese nula de que não há diferença entre as variâncias dos resíduos (há homoscedasticidade) foi testada contra a hipótese alternativa de que as variâncias dos resíduos são diferentes (há heteroscedasticidade). O parâmetro do teste é a razão entre as variâncias  $F$  sendo a maior variância no numerador e a menor no denominador (Equação E.16). A hipótese nula é rejeitada se o valor de  $F$  for maior que o valor crítico  $F_{(1-\alpha/2; n_1-2; n_2-2)}$  (SNEDECOR; COCHRAN, 1989).

$$F = \frac{S_{res_1}^2}{S_{res_2}^2} \quad \text{Equação E.16}$$

Havendo homoscedasticidade, as inclinações e interseções das curvas de solventes e de matriz seriam comparadas pelo teste  $t$  com variâncias combinadas (Equações E.17 e E.18). A hipótese nula de que as inclinações ou interseções não diferem entre si seria testada contra a hipótese alternativa de que as mesmas são diferentes. A hipótese nula seria rejeitada se valor de  $t_b$  ou  $t_a$  for superior ao crítico  $t_{(1-\alpha/2; n_1+n_2-4)}$  (ARMITAGE; BERRY, 1994).

$$t_b = \frac{|b_1 - b_2|}{\sqrt{\frac{S_p^2}{S_{xx_1}} + \frac{S_p^2}{S_{xx_2}}}} \quad \text{Equação E.17}$$

$$t_a = \frac{|a_1 - a_2|}{\sqrt{\frac{S_p^2 \sum x_1^2}{n_1 S_{xx_1}} + \frac{S_p^2 \sum x_2^2}{n_2 S_{xx_2}}}} \quad \text{Equação E.18}$$

sendo que índices 1 e 2 referentes, respectivamente, às curvas do analito no solvente e em matriz;

$$s_p^2 = \frac{(n_1 - 2)s_{res_1}^2 + (n_2 - 2)s_{res_2}^2}{n_1 + n_2 - 4}$$

#### 3.2.5.4. Seletividade, Repetibilidade e Recuperação

A seletividade foi determinada analisando-se o perfil cromatográfico obtido de três repetições da amostra AMB e daquelas fortificadas no nível correspondente a 4,5 µg/L, avaliando-se a separação e resposta esperada em relação ao observado (SOUZA, 2007)

A repetibilidade sob condições equivalentes (mesmo analista, mesmo equipamento, mesmo laboratório, mesmos reagentes e curto período de tempo). Foram realizados dez ensaios onde a amostra AMB foi adicionada por alíquota correspondente ao nível 4,5 µg/L da curva analítica (ABNT, 2012). Tais valores foram então utilizados em todo tratamento estatístico (SOUZA, 2007).

Na recuperação, a amostra AMB foi fortificada nos níveis correspondentes a 0,5; 2,5; 4,5; 6,5; 8,5; 10,5 µg/L, sendo realizado três repetições para cada nível de concentração. A alíquota de 150 µL foi acrescida a massa (3,0 g) da fórmula infantil em pó e homogeneizada por aproximadamente 10 minutos, antes do início do tratamento da amostra (SOUZA, 2007).

##### *Seletividade*

O procedimento já descrito teve por objetivo verificar a existência de co-eluição da BFA com outros componentes no sistema cromatográfico. A inspeção visual foi considerada suficiente para determinação da seletividade.

##### *Recuperação*

A recuperação foi estimada a partir de três repetições de amostras adicionadas em cada nível de concentração. Os valores extremos das recuperações aparentes foram avaliados segundo teste de Grubbs. A recuperação aparente foi calculada através da equação E.19.

$$R_i = \frac{(M_{iA} - M_{iB}) \times 100}{C_{iT}} \quad \text{Equação E.19}$$

sendo

$M_{iA}$  = migração estimada de BFA para as amostras adicionadas

$M_{iB}$  = migração estimada de BFA para a amostra AMB

$C_{iT}$  = concentração teórica adicionada

Após análise inicial dos dados os valores de recuperação aparente de cada nível foram dispostos em rol para avaliação de valores extremos pelo teste de Grubbs. Os parâmetros de  $G_1$  (equações E.20 e E.21),  $G_2$  (equação E.22) e  $G_3$  (equações E.23 e E.24) foram realizados para os grupos de resultados de recuperação aparente de cada nível de concentração.

$$G_{1L} = \frac{|\bar{R} - R_1|}{s} \quad \text{Equação E.20}$$

$$G_{1U} = \frac{|\bar{R} - R_n|}{s} \quad \text{Equação E.21}$$

$$G_2 = \frac{R_n - R_1}{s} \quad \text{Equação E.22}$$

$$G_{3L} = 1 - \left( \frac{(n-3)s_{n-2}^2}{(n-1)s^2} \right) \quad \text{Equação E.23}$$

$$G_{3U} = 1 - \left( \frac{(n-3)s_{n-2}^2}{(n-1)s^2} \right) \quad \text{Equação E.24}$$

sendo

$$\bar{R} = \frac{\sum_{i=1}^n R_i}{n}, \text{ média da recuperação aparente, no nível de migração estudado.}$$

$n$  = nº de observações do nível de migração estudado.

$R_i$  = menor recuperação aparente, no nível de migração estudado.

$R_n$  = maior recuperação aparente, no nível de migração estudado.

$$s = \sqrt{\frac{\sum (R_i - \bar{R})^2}{n-1}}, \text{ desvio padrão das recuperações aparentes, no nível de migração}$$

estudado.

$$s_{n-2}^2 = \frac{\sum (R_i - \bar{R})^2}{n-2-1}, \text{ variância das recuperações aparentes, excluindo os dois valores}$$

extremos, no nível de migração estudado.

$s^2 = \frac{\sum (R_i - \bar{R})^2}{n-1}$ , variância das recuperações aparentes, no nível de migração estudado.

Valores da estatística de Grubbs superiores a valores críticos para um nível de significância de 0,05 foram considerados extremos. Os resultados médios de recuperação aparente foram comparados a critérios de aceitabilidade para exatidão descritos pela UE (2002). A recuperação média dentro de tais valores indica que não há falta de exatidão. O valor deve ser analisado para cada nível de concentração separadamente.

### *Repetibilidade*

Os experimentos conduzidos sob condições de repetibilidade permitem que a precisão seja expressa em termos de coeficiente de variação  $CV(\%)$  (equação E.25) dos resultados de recuperação aparente obtidos em cada nível estudado.

$$CV(\%) = RSD_r = \frac{100 \times s}{\bar{R}} \quad \text{Equação E.25}$$

No entanto, a estatística adotada para avaliação da precisão foi o *HorRat*, obtido a partir do  $RSD_R$  e  $PRSD_R$ , sob condições de reprodutibilidade. O  $PRSD_R$ , calculado a partir do  $\sigma_T = 0,22c$  dividido pela concentração estudada em fração de massa (sendo  $c$  a concentração do analito expressa em fração de massa), é um critério de aceitabilidade estimado pela função de Horwitz e Albert (2006). Para condições de repetibilidade, o *HorRat* (equação E.26) pode ser obtido pelo  $CV(\%)$  dividido pelo  $PRSD_r$  estimado. Esse último é igual a, no máximo, dois terços do valor do  $PRSD_R$  (HORWITZ e ALBERT, 2006; UE, 2002). Em casos onde o limite de restrição é superior a 0,1 mg/kg, o valor do *HorRat* deve ser inferior ou igual a 2.

$$HorRat = \frac{CV(\%)}{\frac{2}{3} PRSD_R} \quad \text{Equação E.26}$$

### 3.2.5.5. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os limites de detecção (Equação E.27) e quantificação (Equação E.28) foram determinados a partir da curva analítica, após exclusão de possíveis valores extremos. O método baseia-se na curva preparada e no seu intervalo de confiança (MILLER; MILLER, 1993; HUBER, 2003).

$$LD = \frac{(Y_{sup} - a)}{b} \quad \text{Equação E.27}$$

$$LQ = \frac{(2 \times LD \times b + a) + t(0,05;n-2) \times Syx \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(2 \times LD - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}}{b} \quad \text{Equação E.28}$$

onde,

$$Y_{sup} = a + t(0,05;n-2) \times Syx \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

### 3.2.6. Incerteza de Medição

A metodologia adotada para a determinação de incerteza de medição baseia-se em recomendações da Eurachem/CITAC (2001).

A incerteza é um parâmetro associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão de valores que poderiam ser atribuídas ao mensurando (Vocabulário Internacional de Termos Básicos e Genéricos em Metrologia - VIM). A incerteza de medição, em geral, compreende inúmeros componentes. Cada componente é caracterizado como uma fonte de incerteza associada a contribuições distintas. Assim, num primeiro momento, foram analisados e quantificados separadamente, dando origem ao que se denomina incerteza padronizada  $u_c$ . Para uma medição, a incerteza total é denominada de incerteza padronizada combinada  $u_c(y)$ . Contudo, na maioria das aplicações em química analítica deve ser utilizada a incerteza expandida  $U$ .

A identificação das fontes de incerteza obedeceu a critérios próprios de maior relevância sobre o valor do mensurando. Dentro da metodologia, poderiam ser

enumerados diversos componentes de incerteza, porém, o trabalho ateve-se a três principais. A incerteza da diluição dos padrões, da curva analítica e da repetibilidade do equipamento foram identificadas e consideradas mais relevantes para a determinação do parâmetro no método. A incerteza padronizada de cada componente foi estimada através das equações E.31, E.32 e E.33. A estimativa da incerteza da diluição dos padrões exige a determinação da incerteza da solução estoque e de cada padrão separadamente (equações E.29 e E.30, respectivamente). No caso, a determinação da incerteza das soluções estoque apresenta uma dificuldade, pois é necessário que a pureza do padrão esteja associada a um valor de incerteza de medição. O padrão de BFA disponível não se trata de um material de referência certificado no qual constaria um valor de pureza e incerteza. Diante desse fato, realizou-se procedimento alternativo para confirmação da pureza do padrão relatada pelo fabricante e o estabelecimento de uma incerteza aproximada. Com esse intuito, foram conduzidas cinco injeções originadas de repetições de análise. O desvio padrão dos resultados foi utilizado para o cálculo da incerteza.

$$u_{est} = \sqrt{\left(\frac{P_p \times u_m}{100 \times V_f}\right)^2 + \left(\frac{P_p \times m \times u_v}{100 \times V_f^2}\right)^2 + \left(\frac{u_p \times m}{100 \times V_f}\right)^2} \quad \text{Equação E.29}$$

sendo

$u_{est}$  = incerteza da solução estoque

$P_p$  = pureza do padrão de BFA

$u_m$  = incerteza da pesagem da massa

$V_f$  = volume final da solução

$m$  = massa do padrão

$u_v$  = incerteza do volume final

$u_p = \frac{s}{\sqrt{n}}$ , incerteza da pureza do padrão definida por

$s$  = desvio padrão das purezas mensuradas

$n$  = número de repetições

$$u_{(P_n)} = \sqrt{\left(\frac{C_{est} \times u_{aliq}}{V_f}\right)^2 + \left(\frac{V_{aliq} \times u_v \times C_{est}}{V_f^2}\right)^2 + \left(\frac{V_{aliq} \times u_{est}}{V_f}\right)^2} \quad \text{Equação E.30}$$

sendo

$u_{(P_n)}$  = incerteza do preparo do padrão

$C_{est}$  = concentração da solução estoque

$u_{aliqu}$  = incerteza do volume da alíquota

$V_{aliqu}$  = volume da alíquota

$$u_{(dil)} = \sqrt{\left(\frac{u_{(P_1)}}{C_{P_1}}\right)^2 + \left(\frac{u_{(P_2)}}{C_{P_2}}\right)^2 + \dots + \left(\frac{u_{(P_n)}}{C_{P_n}}\right)^2} \quad \text{Equação E.31}$$

sendo

$u_{(dil)}$  = incerteza combinada da diluição dos padrões

$C_{P_n}$  = concentração de cada padrão

$$u_{(Curva)} = \frac{S_{res}}{B_1} \times \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_0 - \bar{C})^2}{S_{xx}}} \quad \text{Equação E.32}$$

sendo

$u_{(Curva)}$  = incerteza da curva

$C_0$  = concentração da amostra

$\bar{C}$  = concentração média do padrão

$p$  = número de repetições ou replicatas

$$S_{res} = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n [A_j - A_{Esp}]^2}{n - 2}}, \text{ desvio padrão residual onde } A_j = \text{área medida; } n = \text{número de}$$

medições para confecção da curva analítica;  $A_{esp} = B_0 + B_1 \times C_j$ , área esperada tendo

$B_0$  = interseção da curva analítica;  $B_1$  = inclinação da curva analítica;  $C_j$  =

concentração do padrão.

$$S_{xx} = \sum_{j=1}^n (C_j - \bar{C})^2$$

$$u_{(rep)} = \frac{S_{áreas}}{\sqrt{p}} \quad \text{Equação E.33}$$

sendo

$S_{áreas}$  = desvio padrão das respostas (áreas) relativas à amostra em análise

Por sua vez, a incerteza padronizada de cada componente foi combinada de forma a imputar ao valor do mensurando uma incerteza (Equação E.34).



$$u_{Comb} = C_o \times \sqrt{(u_{dil})^2 + \left(\frac{u_{rep}}{C_o}\right)^2 + \left(\frac{u_{curva}}{C_o}\right)^2} \quad \text{Equação E.34}$$

Para que o valor verdadeiro do mensurando se encontre dentro de um intervalo com um nível de confiança de 95%, a incerteza combinada foi multiplicada por um fator de abrangência  $k$  (Equação E.35). O fator de abrangência para um nível de confiança de 95% é 2.

$$U = k \times u_{(Comb)} \quad \text{Equação E.35}$$

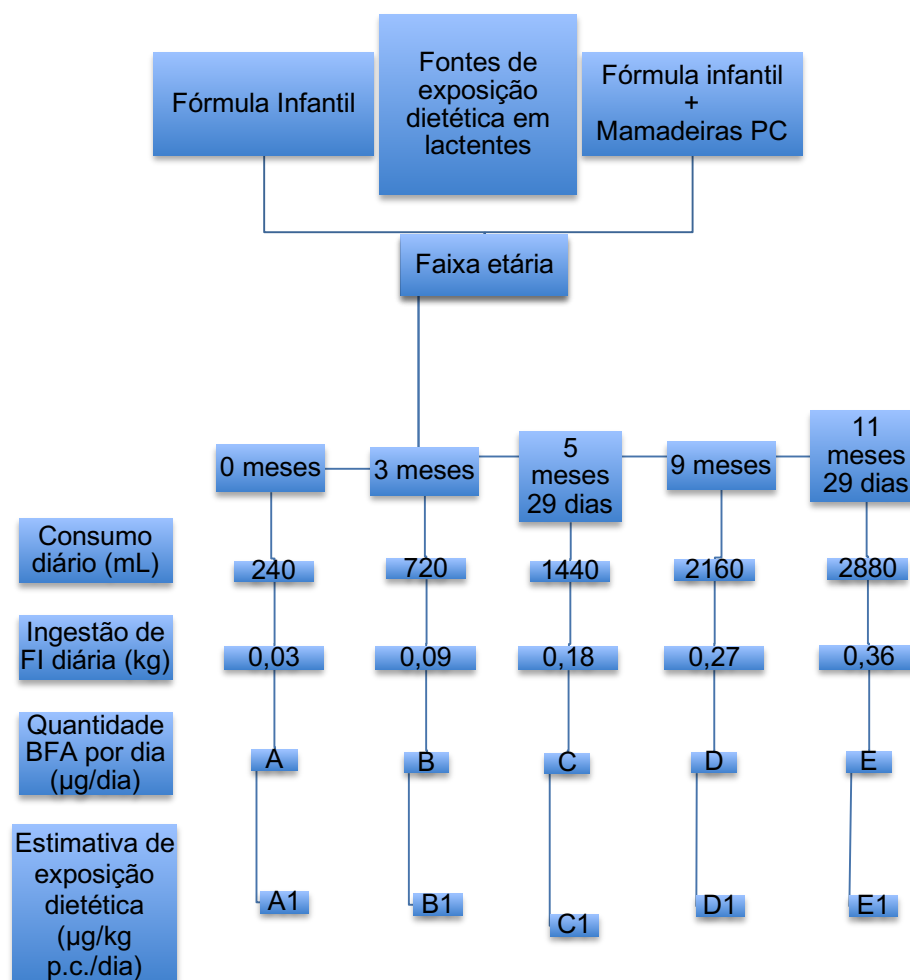
### 3.3. Estimativa dos níveis de exposição diária de lactentes ao BFA

A obtenção dos níveis de exposição dietética diária para lactentes exigiu a adoção de inferências e aproximações que podem não representar com precisão inequívoca a real condição de exposição. Tais aproximações/hipóteses relacionam-se, em princípio, a dados e informações antropométricas e de consumo alimentar que devem ser confrontados com resultados analíticos em matrizes, assumidas como fontes de exposição, objetivando o cálculo do referido indicador. O trabalho aqui em estudo adotará algumas proposições para aspectos antropométricos e atrelados ao consumo alimentar, conforme apresentado na figura 5, tais como:

- a. *Ingestão de FI diária (kg)*: informação obtida a partir da multiplicação do consumo diário de FI (mL) - capacidade gástrica/mês/refeição - pelo número de refeições por dia e baseado na proporção de reconstituição. A capacidade gástrica é definida por Accioly et al. (2002) como 30 mL/mês de idade. O número de refeições foi definido segundo orientação dos fabricantes das fórmulas e rotina na rede hospitalar. Não obstante, o maior número de refeições oferecidas a lactentes, ou seja, o pior cenário foi representado por oito refeições diárias. Outra informação indispensável diz respeito à relação de reconstituição da FI também

fornecida pelo fabricante. O pior cenário envolve uma diluição da FI numa proporção 1/8 (m/v), resultando na quantidade de FI ingerida (kg) por dia.

Figura 5 – Fluxograma para obtenção dos níveis de exposição de lactentes a partir da ingestão dietética de fórmulas infantis em pó antes/após acondicionamento em mamadeiras de PC. Nota: 1) os itens A;B;C;D;E dependem das concentrações de BFA presentes em cada amostra analisada. 2) Para o cálculo das estimativas A1;B1;C1;D1;E1 é necessário considerar o peso da lactente conforme a curva de crescimento infantil da OMS, Peso x Idade (OMS, 2007)



- b. *Estimativa de exposição dietética de lactentes ao BFA ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ ):* o valor foi obtido pela multiplicação da concentração de BFA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  de alimento) na FI analisada pela quantidade de FI ingerida (kg) por dia, informação calculada no item a), sendo o resultado dividido pelo peso do lactente (menino ou menina) conforme a idade, em meses. Para o pior cenário possível, o estudo utilizou o menor peso para lactentes, menino e menina, considerado como adequado na curva de crescimento (Peso x

Idade) da OMS, 2007 (Anexo A e B). Esse valor correspondeu a curva de z-score igual ao valor -2, para cada faixa etária estudada. A tabela 4 indica os pesos considerados:

Tabela 4 – Peso considerado por faixa etária estudada, conforme OMS (2007)

***Faixa etária dos lactentes (m/dias)***

<b>Sexo</b>	0m	3m	5m 29d	9m	11m 29 d
<i>Meninas</i>	2,4	4,5	5,75	6,5	7,0
<i>Meninos</i>	2,6	5	6,4	7,2	7,8

Figura 6 – Curva de crescimento (Peso x Idade) de meninos de 0-5 anos.  
 Fonte: OMS, 2006

## Peso por Idade MENINOS

Do nascimento aos 5 anos (escores-z)

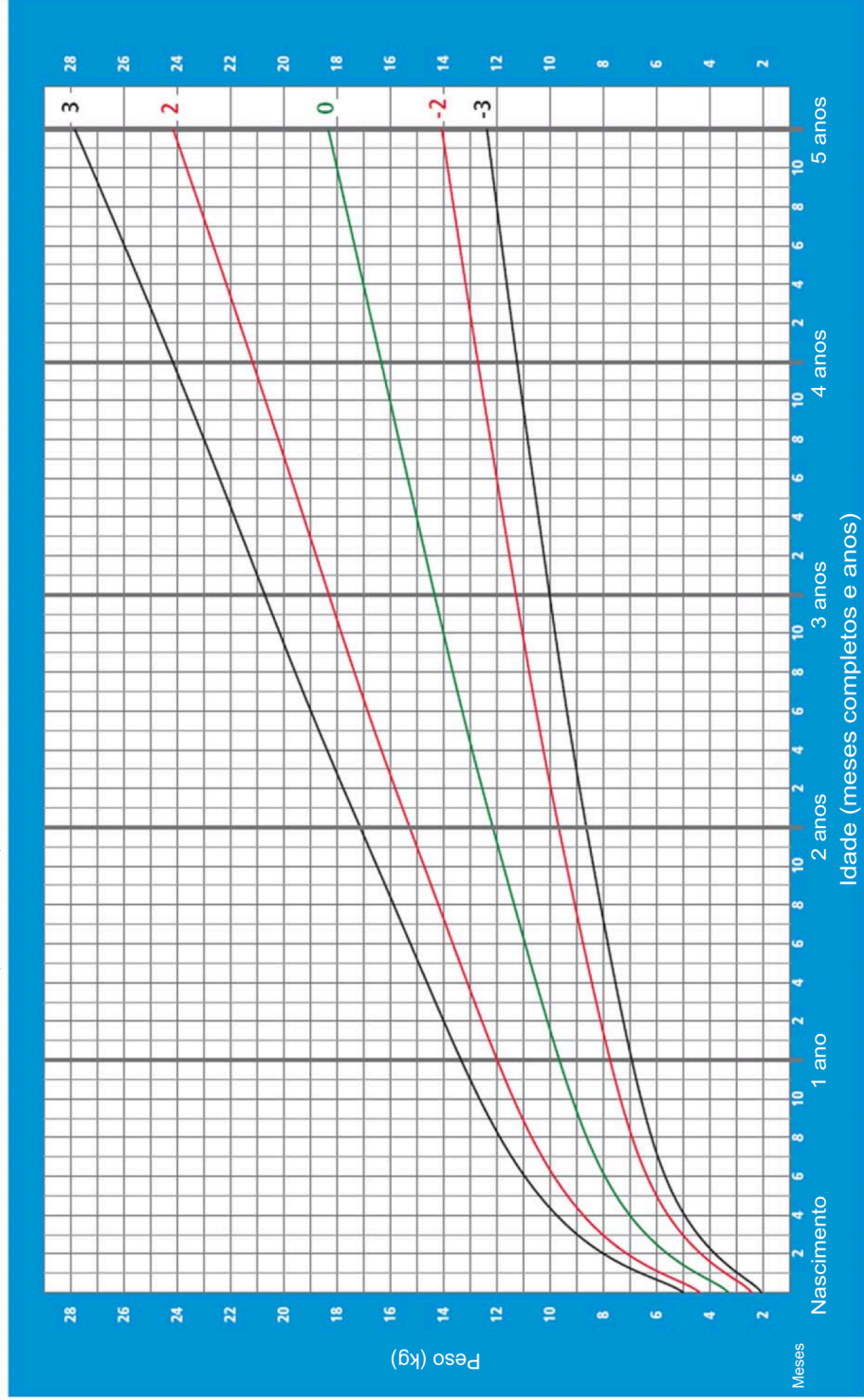
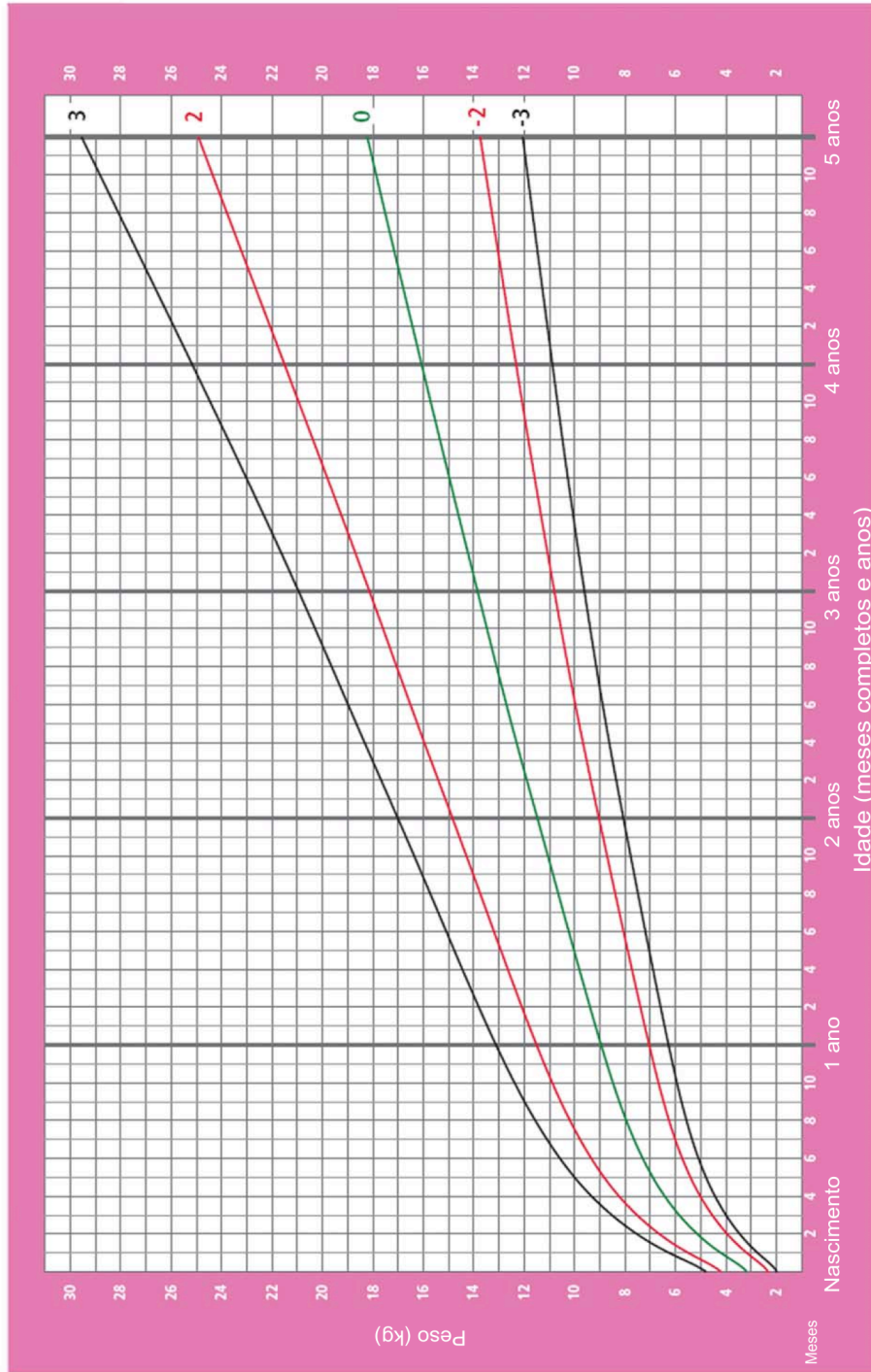


Figura 7 – Curva de crescimento (Peso x Idade) de meninas de 0-5 anos.  
Fonte: OMS, 2006

## Peso por Idade MENINAS

Do nascimento aos 5 anos (escores-z)



### 3.4. Revisão bibliográfica sobre a toxicologia do BFA

A localização dos artigos foi conduzida por meio de ferramentas de busca na rede internacional de computadores. Portais de pesquisa científica como *Science Direct*, Periódicos Capes, o sistema Toxnet de Medicina, o *Micromedex Healthcare Series* e documentos relativos às posições da EFSA, FDA, OMS e EPA com relação ao BFA foram utilizados. Os artigos científicos não disponíveis na internet foram requisitados pelo Comut, com auxílio do Instituto Brasileiro de Informação em Ciência e Tecnologia que coordena o Catálogo Coletivo Nacional de Publicações Seriadas (CCN).

Essa revisão abordou principalmente os efeitos da exposição humana e animal por via oral, a genotoxicidade e mutagenicidade *in vitro*, bem como os efeitos relacionados à desregulação endócrina promovida pela substância.

### 3.5. Proposição de ensaio toxicológico para avaliação da estrogenicidade de substâncias sobre útero

Para o estudo da estrogenicidade do BFA, propõe-se, como modelo experimental, a preparação de útero isolado de rato fêmea segundo POP INCQS nº 65.3310.003 (Ensaio biológico da ocitocina-método da contração do útero isolado de rato fêmea) como método alternativo ao bioensaio uterotrófico que contribuirá para elucidação do mecanismo de ação do BFA.

#### 3.5.1. Animais

Foram utilizados no experimento ratos Wistar fêmeas imaturas com idade de 17 a 19 dias no início do ensaio. Os animais foram fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ). Ratos fêmeas foram mantidos à temperatura ambiente ( $20\pm 4^{\circ}\text{C}$ ), ciclo de 12 h luz e 12 h noite, no Serviço de Animais de Laboratório (SAL) do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) em caixas de polipropileno com “cama” de madeira de *pinus* (maravalha) e com tampa de aço inoxidável em condições descritas no POP INCQS nº 65.3340.002 (Boas Práticas em Experimentação Animal). Um dia após o recebimento, os animais foram marcados e pesados individualmente segundo os POPs INCQS nº 65.3300.002 (Marcação Padrão de Animais de Laboratório) e nº 65.3300.005 (Determinação do Peso Corporal de Animais de Laboratório).

Os animais receberam água e ração comercial (Algomix agroindustrial LTDA, Paraná) *ad libitum* anteriormente e durante o ensaio. O ensaio *in vitro* em preparação isolada de útero de rata foi realizado no Departamento de Farmacologia e Toxicologia do

INCQS. O protocolo experimental empregado foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FIOCRUZ), sob o nº LW-17/14.

### 3.5.2. Procedimento experimental

Num primeiro momento, para teste do sistema, 24 h anteriores à obtenção da preparação isolada de útero, duas ratas imaturas entre o 17º e 19º dia de nascimento foram administradas por via subcutânea em única dose, com 0,1 mL da solução hidroalcoólica de benzoato de estradiol (50 µg/mL) /100g de peso corpóreo, o que corresponde à dose de 50 µg/kg de peso corpóreo. Para a injeção subcutânea foi utilizada agulha 14 x 3,8mm acoplada à seringa de 1 mL

O benzoato de estradiol e o 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE) procedentes ambos da Sigma Aldrich foram utilizados como substâncias estrogênicas de referência quando administrados a ratos fêmeas respectivamente, por vias subcutânea e oral (KANNO et al., 2003).

Nos ensaios por via oral foram administradas através de cânula de intubação metálica no volume de de 2,5 mL/kg, por no mínimo cinco animais/dose/ grupo experimental, por três dias consecutivos, como controle positivo, o EE em óleo de milho (Mazola), nas doses de 1 e 3 µg/kg peso corpóreo/dia; como substância-teste, o BFA em solução aquosa com 10 % de etanol (Merck), nas doses de 300 e 600 mg/kg p.c/dia; os controles-solvente (óleo de milho e solução aquosa etanólica 10% e como provável substância controle negativo, o ftalato de dibutila (FDD) em óleo de milho, 1000 mg/kg p.c./dia. Adicionalmente, dois animais não foram administrados por via oral (controle sem tratamento).

Após 24h, as ratas foram submetidas à eutanásia por exposição à atmosfera enriquecida em dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) em caixa localizada em capela de segurança de animais no SAL, de acordo com o PU3340.008 (Método de Eutanásia para Animais de Laboratório). Em seguida, foi realizada a laparotomia pélvica para a remoção dos dois cornos uterinos de cada um dos animais tratados. Os dois cornos uterinos foram mantidos numa placa de Petri contendo solução nutritiva de Jalon à temperatura ambiente. A solução nutritiva de Jalon foi preparada a partir da diluição de 20X de 300 mL de solução de cloretos (NaCl PM 58,44:180g/1L; KCl PM 74,55: 8,4 g/1L; CaCl<sub>2</sub> .2 H<sub>2</sub>O PM 147,02:1,82 g/L de água destilada) e da diluição 20 X de 300 mL de solução de bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub> PM 84,01: 10g/L de água destilada) a 6L de água destilada. Glicose (PM 180,16): 3,0 g foi adicionada ao volume final de 6L de solução de Jalon. Os cornos uterinos serão dissecados para a remoção cuidadosa do tecido

aderente e limpeza final. Cada corno foi cortado transversalmente em segmentos de aproximadamente 1 cm. Dois destes segmentos foram amarrados com fios de algodão à extremidade inferior de cada uma das duas cubetas de vidro do banho de órgão isolados (Ugo Basile) contendo 13 mL de solução de Jalon borbulhada com carbogênio (mistura 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>) mantida à temperatura ambiente de cerca de 28°C para se evitar a indução de contrações espontâneas e para que a preparação uterina se estabilize mantendo a sua sensibilidade. A outra extremidade dos segmentos do útero foi presa ao transdutor de contração isométrico conectado ao registrador de 2 canais (Ugo Basile Sri) para o registro das contrações uterinas. Através da cremalheira, a preparação foi tensionada com carga aproximada de 1,0 g e a montagem permaneceu em repouso por 1h a 1h 30min para a estabilização. A solução das cubetas foi removida e lavada uma vez com a solução de Jalon antes da adição das soluções de ocitocina (União Química). Após a adição de cada concentração da solução de ocitocina, espera-se que o pico referente a contração uterina atinja a sua altura máxima no papel de registro. Após atingir o *plateau*, a solução do banho com ocitocina foi removida e a preparação lavada três vezes com solução de Jalon. Conforme a velocidade de recuperação do órgão, foram adicionadas as diferentes concentrações de ocitocina. As respostas de contração uterina foram indicadas em mm de altura do pico. O objetivo do ensaio foi a obtenção de curvas concentração-resposta de ocitocina no útero (faixa: 0,005 a 200 UI/mL). Foram avaliadas as curvas sigmóides log concentração-resposta à ocitocina em animais pré-tratados com o EE, o BFA, com o controle negativo ftalato de n-butila e controles-solventes (óleo de milho e solução aquosa etanólica 10%) quanto aos parâmetros de concentração efetiva média (CE<sub>50</sub>), efeito máximo possível (E<sub>max</sub>), coeficiente de correlação (R) e de inclinação (Hill slope) no ponto de inflexão das curvas obtidas. No tratamento estatístico dos dados e na construção da curva sigmóide log concentração-resposta (contração uterina em mm ou % de efeito máximo) foi utilizado o programa Graphpad Prism versão 5.0.



## 4. Resultados e Discussão

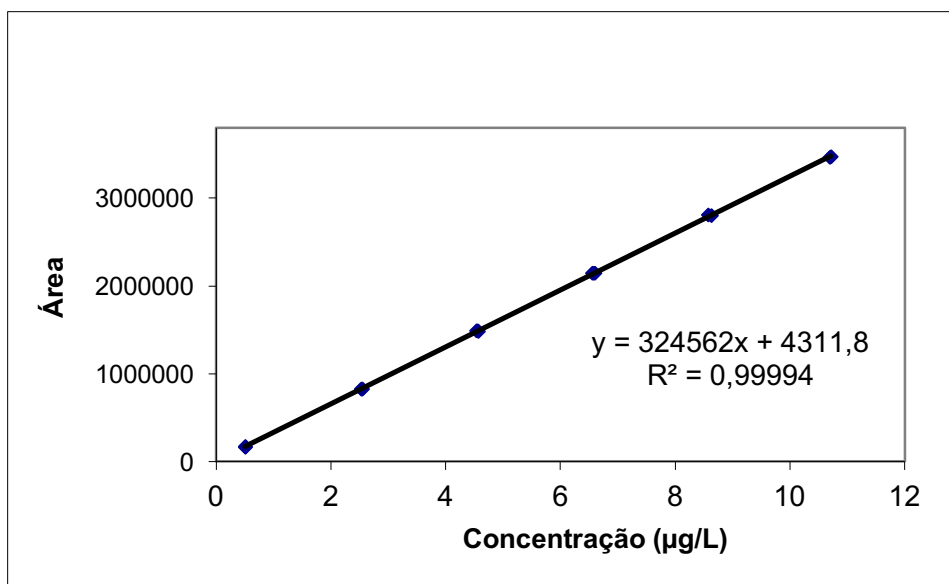
### 4.1. Validação do método

Os resultados obtidos a partir de procedimentos já mencionados e referentes a validação do método são apresentados nos itens subsequentes.

#### 4.1.1. Linearidade e curva analítica

A avaliação da linearidade e a confecção da curva analítica (Figura 8) foram realizadas através do método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO). Para a utilização do MMQO, deve-se efetuar o teste de modo a confirmar as premissas do método. As premissas devem ser satisfeitas, caso contrário, o MMQO não pode ser realizado. Estas se relacionam aos resíduos da regressão e dizem respeito a testes de normalidade, independência, autocorrelação e homogeneidade das variâncias dos resíduos, além da análise de variância da regressão e desvio da linearidade dos resíduos foram realizados. Os valores extremos foram analisados previamente. A cada exclusão, os testes eram novamente executados.

Figura 8 – Curva analítica do BFA em solvente (Área x Concentração em µg/L)



#### *Tratamento de valores extremos*

Após realização do teste de resíduos padronizados Jackknife, duas repetições ou dados foram rejeitados, permanecendo dentro do limite de 22,2% das mensurações estabelecido por Horwitz (1995). O MMQO assim como a identificação de valores extremos foram recalculados a cada rejeição de dados. No entanto,

precisa ser considerado que a existência de inúmeros extremos pode estar associado à ocorrência de erros sistemáticos. A realização de novo procedimento seria, então, a conduta mais correta.

#### *Teste de normalidade dos resíduos*

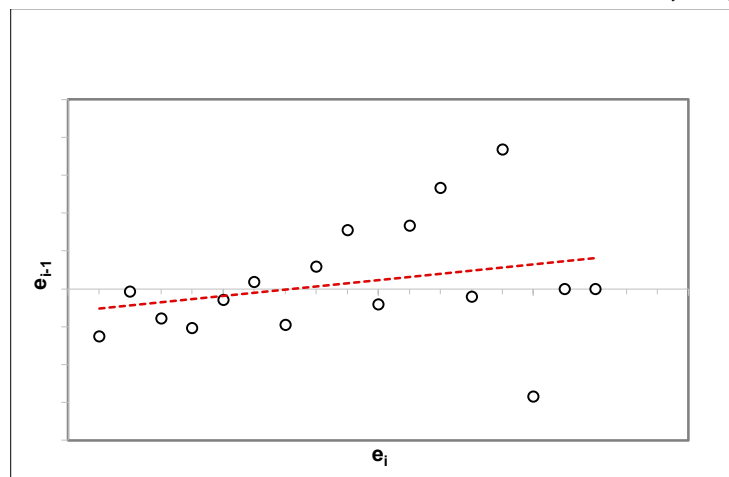
Os resultados demonstram que o conjunto de dados seguem a distribuição normal. Isso pode ser constatado de duas formas. Uma pelo coeficiente de correlação Ryan-Joiner (teste Ryan-Joiner). O coeficiente de correlação calculado (0,98) foi superior ao valor crítico estabelecido de 0,94 ( $\alpha = 0,05$ ), não havendo razões para rejeitar a hipótese nula de que os dados seguem a distribuição normal.

#### *Teste de homogeneidade das variâncias dos resíduos da regressão*

O teste de Levene adaptado por Brown-Forsythe para avaliar a homogeneidade das variâncias dos resíduos foi realizado. As estatísticas de análise são os valores de  $t_L$  e a significância  $p$ . O valor de  $t_L$  calculado foi igual a 1,39 e inferior ao  $t_L$  tabelado de 2,14. A significância  $p$  calculada foi 0,187, superior a significância 0,05. Como os valores de  $t_L$  e da significância  $p$  calculados satisfizeram os critérios, é aceita a hipótese nula de que as variâncias dos resíduos da regressão são constantes e conclui-se que há homogeneidade das mesmas.

#### *Teste de independência dos resíduos*

A autocorrelação ou independência dos resíduos da regressão foi avaliada pelo teste de Durbin-Watson. A estatística do teste é o valor de  $d$ , inferiores ou superiores. O valor de  $d$  calculado foi igual a 1,84, acima dos valores críticos para  $d_L$  e  $d_U$ , respectivamente, 1,11 e 1,37 ( $\alpha = 0,05$ ). Ou seja, a hipótese nula não foi rejeitada e confirmou-se a independência dos resíduos da regressão. A figura 9 representa graficamente a independência dos resíduos da regressão.

Figura 9 - Gráfico de Durbin-Watson da curva analítica ( $e_i \times e_{i-1}$ )

#### Análise de variância dos resíduos da regressão

A regressão linear bem como o ajuste ao modelo foi confirmada através da ANOVA. Os dados são apresentados na tabela 5.

**Tabela 5 – Resultados da análise de variância para significância da regressão ( $\alpha = 0,05$ )**

<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>Significância</i>
Regressão	1	$1,87 \times 10^{13}$	$1,87 \times 10^{13}$	$2,34 \times 10^{13}$	$5,80 \times 10^{-30}$	<b><math>p &lt; 0,001</math></b>
Resíduos	14	$1,12 \times 10^9$	$8,01 \times 10^7$			
Total	15	$1,87 \times 10^{13}$				

Regressões significativas ( $p < 0,001$ ) foram observados nos testes de F.

Ao final, a linearidade do método foi comprovada na faixa de trabalho de 0,5 a 10,5  $\mu\text{g/L}$ . A equação final de regressão foi  $y = 324562x + 4311,8$ , sendo  $y$  a área do pico do BFA e  $x$  a concentração do analito.

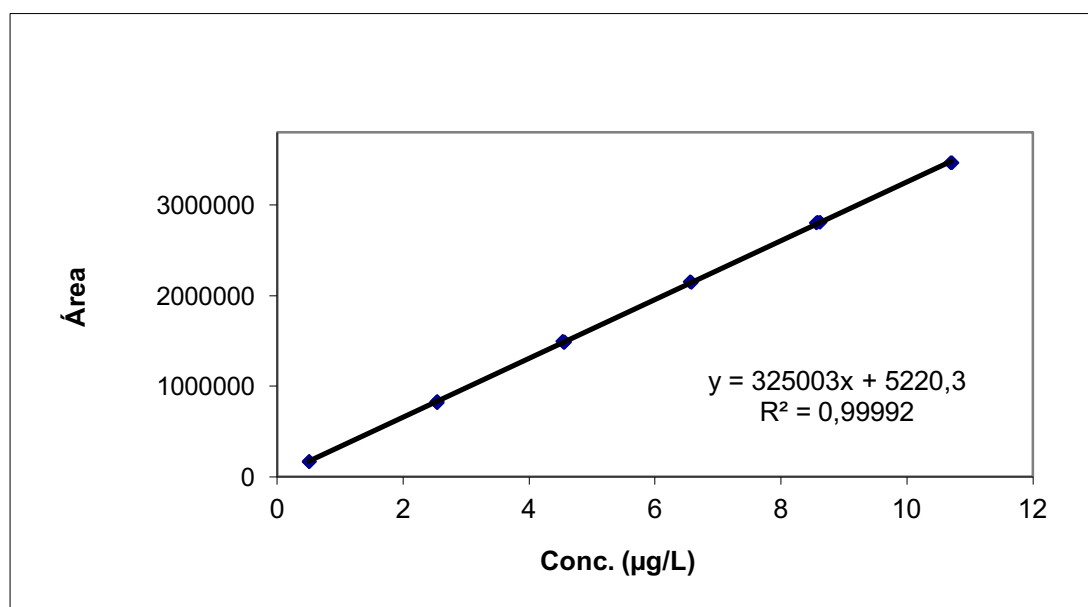
#### 4.1.2. Efeito matriz

A amostra AMB foi adicionada, nas concentrações de trabalho da curva analítica. A curva analítica do BFA em matriz pode ser visualizada na Figura 10. Pelo teste padronizado de resíduos Jackknife, foram rejeitados dois valores extremos.

Durante a avaliação do efeito matriz, Souza (2007) relata que somente os testes de normalidade e ajuste ao modelo linear são considerados requisitos. Porém, todos os testes de premissas foram realizados (tabela 6).

**Tabela 6 – Testes de premissas para curva analítica em matriz ( $\alpha = 0,05$ )**

Testes estatísticos	Estatística	Matriz	Valor crítico
<i>Normalidade</i>	$R$	0,97	0,94
<i>Homoscedasticidade</i>	$t_L; p$	1,30; $p = 0,216$	2,14; $p > 0,05$
<i>Independência</i>	$d$	1,63	$d_L = 1,11; d_U = 1,37$
<i>Regressão</i>	$p$	$5,84 \times 10^{-30}$	$< 0,001$

Figura 10 – Curva analítica do BFA em matriz (Área x Concentração em  $\mu\text{g/L}$ )

Os dados do analito em solvente foram aqueles obtidos no momento da avaliação da linearidade.

Satisfeitas as premissas e confirmada a linearidade do analito em matriz, as etapas subsequentes como o teste de homoscedasticidade das variâncias dos resíduos e o teste  $t$  para variâncias combinadas foram realizados (tabela 7).

**Tabela 7 – Resultados dos testes para avaliação do efeito matriz ( $\alpha = 0,05$ )**

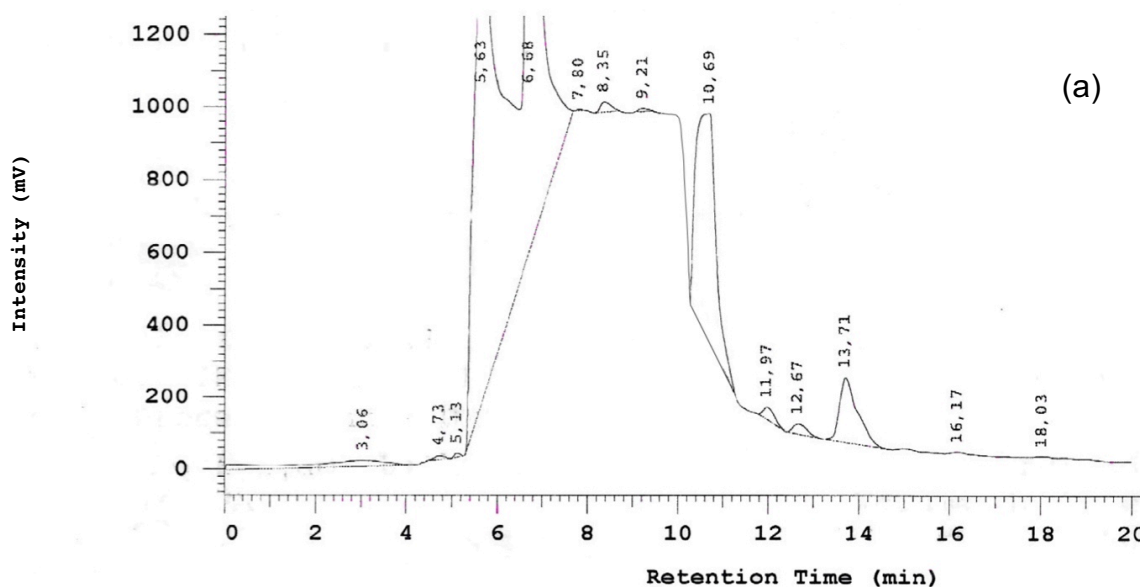
Testes estatísticos	Estatística	Calculado	Valor crítico
<i>Homoscedasticidade das variâncias dos resíduos</i>	$F$	1,47	2,48
<i>Teste t para variâncias combinadas</i>	$t_b; t_a$	$t_b = 0,42$ $t_a = 0,14$	2,05

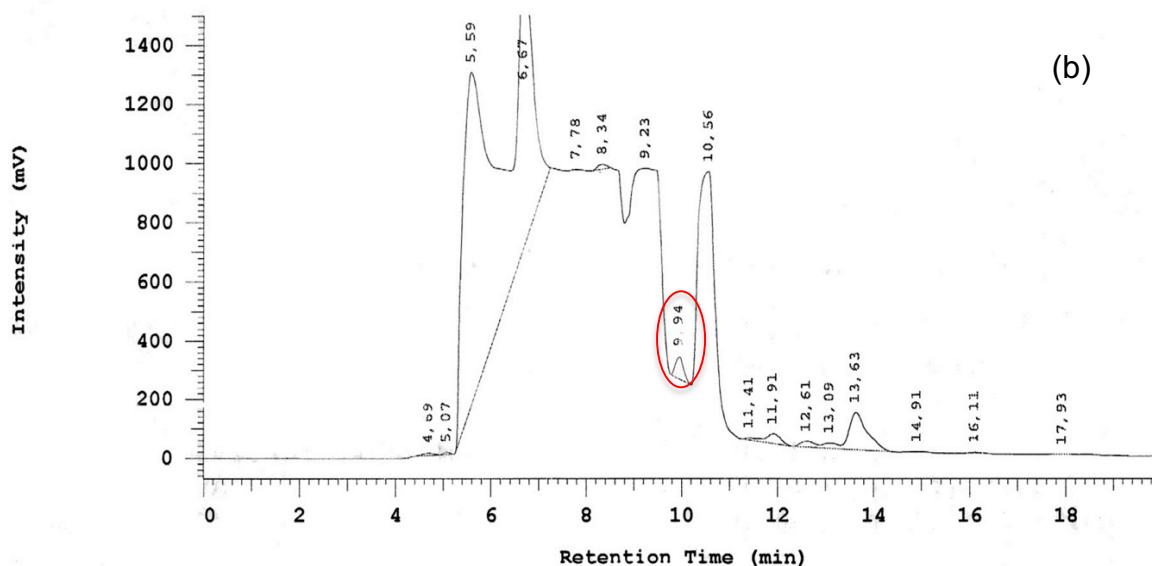
Conforme apresentado na tabela 5, os resultados dos testes permitem afirmar que o método não apresenta efeito matriz, pois, estatisticamente ( $\alpha = 0,05$ ), as curvas analíticas de BFA em solvente e em matriz se equivalem.

#### 4.1.3. Seletividade

A seletividade foi determinada basicamente por inspeção gráfica onde se constatou a ausência de picos interferentes, próximos ao tempo de retenção do BFA, em brancos de ensaio com a amostra AMB. Paralelamente, a fortificação de amostras AMB demonstrou a eficiência da separação entre o pico de BFA e os demais, assim como a compatibilidade entre as respostas observadas e esperadas para a quantidade acrescida. O fato foi considerado suficiente para determinação da seletividade. A figura 11 apresenta os cromatogramas que sustentam tal colocação.

Figura 11 – (a) Cromatograma típico da amostra branca (AMB); (b) cromatograma típico de uma amostra fortificada correspondente ao nível de  $4,5\mu\text{g/L}$ ,  $t_r = 9,94$  min





#### 4.1.4. Repetibilidade

Os resultados obtidos de *CV* e de *PRSDr* foram 0,40% e 22%, respectivamente. O valor de *HorRat* calculado (0,027) indica que o método apresenta repetibilidade adequada, uma vez que é inferior ao critério de aceitabilidade determinado (2,0) pela equação de Horwitz e Albert (2006).

#### 4.1.5. Recuperação

Os valores obtidos (tabela 8) para a recuperação média em cada nível de concentração encontram-se dentro de limites estabelecidos pela UE (2002). Caso o laboratório não disponha de materiais de referência certificados para realização dos ensaios, Souza (2007) sugere que o método não seja caracterizado como exato. O adequado seria considerar que não há indicativo de falta de exatidão para o método.

**Tabela 8 – Avaliação da recuperação do método para cada nível de concentração**

Estatística	Concentração (µg/L)	Valor Calculado (%)	Critério de aceitabilidade	Fonte
$\bar{R}$ (%)	0,5	70	50 a 120%	UE, 2002
	2,5	82		
	4,5	84	70 a 110%	
	6,5	89		
	8,5	87		
	10,5	89	80 a 110%	

#### 4.1.6. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

A determinação de limites de detecção e quantificação são particularmente importantes em métodos quantitativos para a determinação de analitos em níveis de traço. Assim, é preciso mensurar a resposta mínima no sistema analítico que podem ser seguramente distinguidas de zero (LD) e a menor concentração do analito determinada com precisão e exatidão (LQ).

A curva analítica de equação  $y = 324562x + 4311,8$  (figura 8) foi utilizada para a determinação dos limites. Os limites de detecção e quantificação obtidos foram 0,065 e 0,195  $\mu\text{g/L}$ , respectivamente. Tais valores, abaixo da faixa de trabalho selecionada, indicam a possibilidade de redução na concentração do primeiro nível (0,5 $\mu\text{g/L}$ ) de modo a aproximá-lo do LQ do método.

#### 4.2. Resultados analíticos das fórmulas infantis

A quantidade de BFA presente nas amostras analisadas são apresentadas na Tabela 9.

**Tabela 9 – Resultados analíticos provenientes da determinação de bisfenol A em fórmulas infantis**

Fórmulas de partida	Resultados analíticos ( $\mu\text{g/kg}$ )	Fórmulas de seguimento	Resultados analíticos ( $\mu\text{g/kg}$ )
01	0,47 $\pm$ 0,08	01	0,16 $\pm$ 0,05
02	0,50 $\pm$ 0,01	02	3,53 $\pm$ 1,02
03	0,60 $\pm$ 0,07	03	9,14 $\pm$ 1,36
04	4,70 $\pm$ 0,93	04	5,03 $\pm$ 0,83
05	5,92 $\pm$ 0,83	05	4,26 $\pm$ 0,58
06	3,69 $\pm$ 0,37	06	9,64 $\pm$ 0,89
07	6,13 $\pm$ 0,59	07	6,84 $\pm$ 0,67
08	3,30 $\pm$ 0,13	08	0,21 $\pm$ 0,10
09	0,93 $\pm$ 0,27	09	8,65 $\pm$ 0,69
10	5,27 $\pm$ 0,74	10	0,58 $\pm$ 0,01
11	3,17 $\pm$ 0,30	11	1,68 $\pm$ 0,37
12	0,30 $\pm$ 0,11	12	0,42 $\pm$ 0,13
13	8,91 $\pm$ 0,83	13	7,23 $\pm$ 0,51
14	5,10 $\pm$ 0,66	14	7,06 $\pm$ 1,37
15	5,32 $\pm$ 0,52	15	1,69 $\pm$ 0,22

16	4,81 ±0,63	16	6,69 ±0,78
17	5,41 ±0,89	17	6,53 ±0,86
18	8,85 ±0,76	18	6,78 ± 0,45
19	1,56 ±0,40	19	1,29 ±0,30
20	6,72 ±0,95	20	1,37 ±0,27
21	6,97 ±0,79	21	7,88 ±0,71
22	8,84 ±0,64	22	0,51 ±0,08
23	1,36 ±0,38	23	1,65 ±0,24
24	0,66 ±0,24	24	1,83 ±0,16
25	7,57 ±0,53	25	6,45 ±0,85
26	5,17 ±0,33	26	5,12 ±0,43
27	1,33 ±0,13	27	10,20 ±1,25
28	4,84 ±0,30	28	4,99 ±1,03
29	4,17 ±0,65	29	0,16 ±0,05
30	7,26 ±0,94	30	3,53 ±0,41

O BFA é inerentemente onipresente no meio ambiente. A contaminação residual por BFA ou *background* ocorre em níveis da ordem de ng/L e decorre, principalmente, de solventes, colunas de extração em fase sólida (EFS), copos, utensílios de plástico e outros reagentes e instrumentos de laboratório. Em geral, os artigos de vidro tratados termicamente (400°C por 4 horas) e os materiais lavados com solvente são utilizados como uma medida de precaução para evitar a contaminação (SHAO et al., 2007). Nesse estudo, a possibilidade de contaminação por BFA foi eliminada através da adoção de procedimentos adequadas de lavagem, como aplicação de etanol 95% e ultrassom, além da utilização de água deionizada filtrada em membranas Envoy 100.

Os valores encontrados mostram-se compatíveis com trabalhos disponibilizados na literatura. A concentração de BFA em amostras de frutas e vegetais variou entre 5 a 35 µg/kg (GOODSON et al, 2002; THOMSON e GROUNDS, 2005; BRAUNRATH e CICHNA, 2005); vinho, entre 0,2 e 2,1 µg/kg (STRUCKHOFOVA E CICHNA, 2006); ovo, 0,5 µg/kg (SHAO et al., 2007b); carne, entre 0,3 e 22 µg/kg (SHAO et al., 2007a; BRAUNRATH e CICHNA, 2005); peixe, entre 0,3 a 43µg/kg (SHAO et al., 2007a; GOODSON et al, 2002; BRAUNRATH e CICHNA, 2005); leite, entre 0,4 e 10 µg/kg (SHAO et al, 2007b; Maragou et al., 2006). Existem poucos trabalhos com formula infantil disponíveis na literatura. Três trabalhos apresentaram resultados semelhantes, com concentrações de BFA em fórmulas infantis entre 0,1 e 13,2 µg/kg (BILES et al, 1997a), inferiores a 2 µg/kg



(GOODSON et al, 2002) e 2,2 a 10,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (CAO et al., 2008). Ao contrário, outro estudo relatou valores superiores, entre 44 e 113  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (KUO e DING, 2004).

Dessa forma, os resultados de determinações de BFA em fórmulas infantis disponibilizadas pela literatura e aquelas obtidas nesse trabalho apresentam-se abaixo do limite de migração específica (LME) definido pela União Europeia e pelo Brasil de 0,6  $\text{mg}/\text{kg}$  (BRASIL, 2010; UE, 2011).

#### 4.3. Resultados analíticos após ensaio de migração com mamadeiras de PC

As mamadeiras de policarbonato participantes do ensaio de migração não foram previamente utilizadas, configurando-se o primeiro uso. A liofilização das fórmulas infantis selecionadas empiricamente apresentaram resultados satisfatórios. A quantidade de BFA presente nas amostras analisadas após acondicionamento nas mamadeiras são apresentadas na Tabela 10.

**Tabela 10 – Resultados analíticos provenientes da determinação de bisfenol A em fórmulas infantis após acondicionamento em mamadeiras de PC**

Fórmulas de partida	Fabricantes de Mamadeiras	Resultados analíticos ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Fórmulas de seguimento	Fabricantes de Mamadeiras	Resultados analíticos ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
02	A	0,60 $\pm$ 0,25	01	A	0,21 $\pm$ 0,09
06	A	4,80 $\pm$ 0,55	03	A	10,05 $\pm$ 1,26
13	A	10,87 $\pm$ 1,52	06	A	10,60 $\pm$ 1,42
16	A	5,53 $\pm$ 0,77	15	A	2,08 $\pm$ 0,62
17	A	6,71 $\pm$ 0,95	23	B	1,73 $\pm$ 0,38
19	A	2,18 $\pm$ 0,34	26	C	5,58 $\pm$ 0,74
20	A	8,94 $\pm$ 0,98			
23	A	1,60 $\pm$ 0,31			
29	A	5,25 $\pm$ 0,63			
30	A	8,42 $\pm$ 0,92			

O conjunto de amostras não permite qualquer conclusão ou inferência acerca dos fabricantes de mamadeiras estudados. A quantidade de amostras reduzida é explicada pela existência, em meados de 2011, de uma tendência comercial e global de substituição do policarbonato empregado nas mamadeiras por polipropileno,

resultado de pressões midiáticas e do mercado consumidor. Esse fato acarretou a diminuição vertiginosa da fabricação e comercialização desse tipo de produto, antes mesmo de sua proibição em território brasileiro em setembro de 2011 (BRASIL, 2011).

Os resultados para cada grupo de fórmula infantil (partida e seguimento), antes e após acondicionamento nas mamadeiras foram submetidas ao teste t de Student para amostras pareadas. O valor de t calculado para as fórmulas de partida e de seguimento foram, respectivamente, 4,92 e 2,96. Esses valores são superiores ao tabelado para uma distribuição bicaudal, em nível de confiança 95%, 2,26 e 2,57, concluindo-se pela rejeição da  $H_0 : \mu_{\text{antes}} = \mu_{\text{depois}}$ . Dessa forma, há diferença estatística significativa entre as fórmulas infantis antes e após acondicionamento nas mamadeiras de PC.

Em média, a quantidade de BFA após o ensaio de migração experimentou acréscimo de 16,5% em relação a fórmula infantil inicial, inferior ao estimado pela EFSA (2006). No modelo conservador aplicado pela autoridade europeia, a quantidade de BFA quintuplicaria após contato com mamadeiras de PC. Quaisquer comparação entre trabalhos é limitada, pois grande parte dos estudos apresentam resultados analíticos obtidos de ensaios de migração com solventes simulantes de alimentos. Ainda deve ser considerado que o ensaio em questão não contemplou aspectos que podem impactar o fenômeno da migração e alterar a transferência de BFA para o alimento. Apesar da temperatura ser considerada fator preponderante (MARAGOU et al, 2008), existem trabalhos que associam os ciclos de uso, detergentes e utilização de microondas como fatores que devem ser avaliados. Maia et al. (2009) relataram que o uso de detergentes promoveram incremento nos níveis detectados de resíduos de BFA. Maragou et al. (2008) e Kubwabo et al. (2009) relatam redução dos níveis de BFA em simulantes de alimentos após ciclos de uso contínuos, o que contrapõe-se a teoria de degradação do polímero e liberação de BFA ao alimento. Apesar de fabricantes de mamadeiras não recomendarem a aplicação de microondas sobre os materiais plásticos não específicos, estudo de Ehlert et al. (2008) com mamadeiras de PC em simulante água não observou alteração nos níveis de BFA transferidos após a aplicação de microondas. No entanto, a aplicação de microondas sobre materiais constituídos de PC podem acentuar a migração de substâncias como 9,9-dimetilxanteno and m-terc-butil-fenol, para simulantes de alimentos gordurosos. Além disso, pode deflagrar a presença de outras substâncias como benzofenona em simulante água e 4-etil -etoxi-benzoato

em simulantes gordurosos (ALIN e HAKKARAINEN, 2012).

Salienta-se que os níveis de BFA provenientes das mamadeiras de PC encontram-se dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira e europeia, 0,6 mg / kg de alimento (UE, 2011b; BRASIL, 2011).

#### 4.4. Estimativa de exposição dietética em lactentes

O BFA é utilizado em inúmeras aplicações industriais e produtos de consumo, o que resulta numa exposição onipresente. Definir ou estimar a exposição ao BFA torna-se tarefa complexa, pois deve considerar todas as fontes de exposição possíveis, não somente as fontes alimentares. Outras fontes potenciais de exposição ao BFA reconhecidas são água potável, ar (MIYAMOTO e KOTAKE, 2006; WILSON et al., 2007), poeira (WILSON et al., 2007; RUDEL et al., 2001; RUDEL et al., 2003), cosméticos (VANDENGERG et al., 2007; DODSON et al., 2012; EFSA, 2013), papel térmico (GEENS, 2012; LIAO e KANNAN, 2011) e selantes dentais (JOSKOW et al., 2006). Em geral, a exposição ao BFA a partir de fontes não-alimentares são determinadas pela combinação de informações publicadas sobre as concentrações de BFA em cada meio (poeira, ar e água potável), com taxas de contato específicos das faixas etárias estudadas (EPA, 2010). Em especial no Brasil, a ausência de políticas públicas de controle e monitoramento do meio ambiente com grau de detalhamento e publicidade comparáveis a países como Estados Unidos, representado pela *Environmental Protection Agency*, dificultam qualquer inferência acerca da exposição ao BFA originado de tais fontes.

Embora o aspecto ambiental deva ser mensurado e integrar qualquer estimativa, no que tange a exposição humana ao BFA os trabalhos concluem que a via principal é a dietética (WHO, 2010; MIYAMOTO e KOTAKE, 2006; GOETZ et al., 2010; UE, 2003; WILSON et al., 2007). A abordagem para a obtenção de estimativas de exposição dietética envolvem a identificação e concentração de BFA nos alimentos combinadas com informações de consumo alimentar das diferentes faixas etárias.

Como já mencionado anteriormente, existem na literatura diversos estudos que determinaram a quantidade de BFA em diferentes matrizes e, a princípio, não constituem um obstáculo para a obtenção de estimativas de exposição dietética. Ao contrário, dados acerca do consumo alimentar envolvem extenso e oneroso estudo, muitas vezes atrelados a políticas públicas, o que os tornam fator limitante para o

cálculo de estimativas de exposição humana. No Brasil, a última pesquisa que produziu alguma informação sobre o consumo alimentar nas diferentes regiões foi o ENDEF (Estudo Nacional de Despesa Familiar, realizado em 1974 e 1975) (IBGE, 1977). O fato resulta na adoção de pressupostos e informações, que podem representar certo grau de incerteza para as estimativas de exposição.

A faixa etária de lactentes é, reconhecidamente, a mais exposta em razão de uma dieta ainda restrita e do peso corpóreo reduzido. Somado a imaturidade fisiológica, o grupo etário ainda motiva as maiores preocupações. Os valores estimados para a exposição dietética ao BFA quando consumidas exclusivamente as fórmulas infantis analisadas foram apresentados na Tabela 11 e 12.

Tabela 11 – Exposição dietética de lactentes ao BFA a partir de fórmulas infantis de partida, em  $\mu\text{g}/\text{kg p.c}/\text{dia}$

Fórmula infantil	Idade (meninas)			Idade (meninos)		
	0 m	3 m	5 m 29 dias	0 m	3 m	5 m 29 dias
1	0,0059	0,0094	0,0147	0,0054	0,0085	0,0132
2	0,0063	0,0100	0,0157	0,0058	0,0090	0,0141
3	0,0075	0,0120	0,0188	0,0069	0,0108	0,0169
4	0,0588	0,0940	0,1471	0,0542	0,0846	0,1322
5	0,0740	0,1184	0,1853	0,0683	0,1066	0,1665
6	0,0461	0,0738	0,1155	0,0426	0,0664	0,1038
7	0,0766	0,1226	0,1919	0,0707	0,1103	0,1724
8	0,0413	0,0660	0,1033	0,0381	0,0594	0,0928
9	0,0116	0,0186	0,0291	0,0107	0,0167	0,0262
10	0,0659	0,1054	0,1650	0,0608	0,0949	0,1482
11	0,0396	0,0634	0,0992	0,0366	0,0571	0,0892
12	0,0038	0,0060	0,0094	0,0035	0,0054	0,0084
13	0,1114	0,1782	0,2789	0,1028	0,1604	0,2506
14	0,0638	0,1020	0,1597	0,0588	0,0918	0,1434
15	0,0665	0,1064	0,1665	0,0614	0,0958	0,1496
16	0,0601	0,0962	0,1506	0,0555	0,0866	0,1353
17	0,0676	0,1082	0,1694	0,0624	0,0974	0,1522
18	0,1106	0,1770	0,2770	0,1021	0,1593	0,2489
19	0,0195	0,0312	0,0488	0,0180	0,0281	0,0439
20	0,0840	0,1344	0,2104	0,0775	0,1210	0,1890

21	0,0871	0,1394	0,2182	0,0804	0,1255	0,1960
22	0,1105	0,1768	0,2767	0,1020	0,1591	0,2486
23	0,0170	0,0272	0,0426	0,0157	0,0245	0,0383
24	0,0083	0,0132	0,0207	0,0076	0,0119	0,0186
25	0,0946	0,1514	0,2370	0,0873	0,1363	0,2129
26	0,0646	0,1034	0,1618	0,0597	0,0931	0,1454
27	0,0166	0,0266	0,0416	0,0153	0,0239	0,0374
28	0,0605	0,0968	0,1515	0,0558	0,0871	0,1361
29	0,0521	0,0834	0,1305	0,0481	0,0751	0,1173
30	0,0908	0,1452	0,2273	0,0838	0,1307	0,2042

Tabela 12 - Exposição dietética de lactentes ao BFA a partir de fórmulas infantis de seguimento, em  $\mu\text{g}/\text{kg p.c}/\text{dia}$

Fórmula Infantil	Idade (meninas)		Idade (meninos)	
	9 m	11m 29 dias	9 m	11m 29 dias
1	0,0066	0,0082	0,0060	0,0074
2	0,1466	0,1815	0,1324	0,1629
3	0,3797	0,4701	0,3428	0,4218
4	0,2089	0,2587	0,1886	0,2322
5	0,1770	0,2191	0,1598	0,1966
6	0,4004	0,4958	0,3615	0,4449
7	0,2841	0,3518	0,2565	0,3157
8	0,0087	0,0108	0,0079	0,0097
9	0,3593	0,4449	0,3244	0,3992
10	0,0241	0,0298	0,0218	0,0268
11	0,0698	0,0864	0,0630	0,0775
12	0,0174	0,0216	0,0158	0,0194
13	0,3003	0,3718	0,2711	0,3337
14	0,2933	0,3631	0,2648	0,3258
15	0,0702	0,0869	0,0634	0,0780
16	0,2779	0,3441	0,2509	0,3088
17	0,2712	0,3358	0,2449	0,3014
18	0,2816	0,3487	0,2543	0,3129
19	0,0536	0,0663	0,0484	0,0595

20	0,0569	0,0705	0,0514	0,0632
21	0,3273	0,4053	0,2955	0,3637
22	0,0212	0,0262	0,0191	0,0235
23	0,0685	0,0849	0,0619	0,0762
24	0,0760	0,0941	0,0686	0,0845
25	0,2679	0,3317	0,2419	0,2977
26	0,2127	0,2633	0,1920	0,2363
27	0,4237	0,5246	0,3825	0,4708
28	0,2073	0,2566	0,1871	0,2303
29	0,0066	0,0082	0,0060	0,0074
30	0,1466	0,1815	0,1324	0,1629

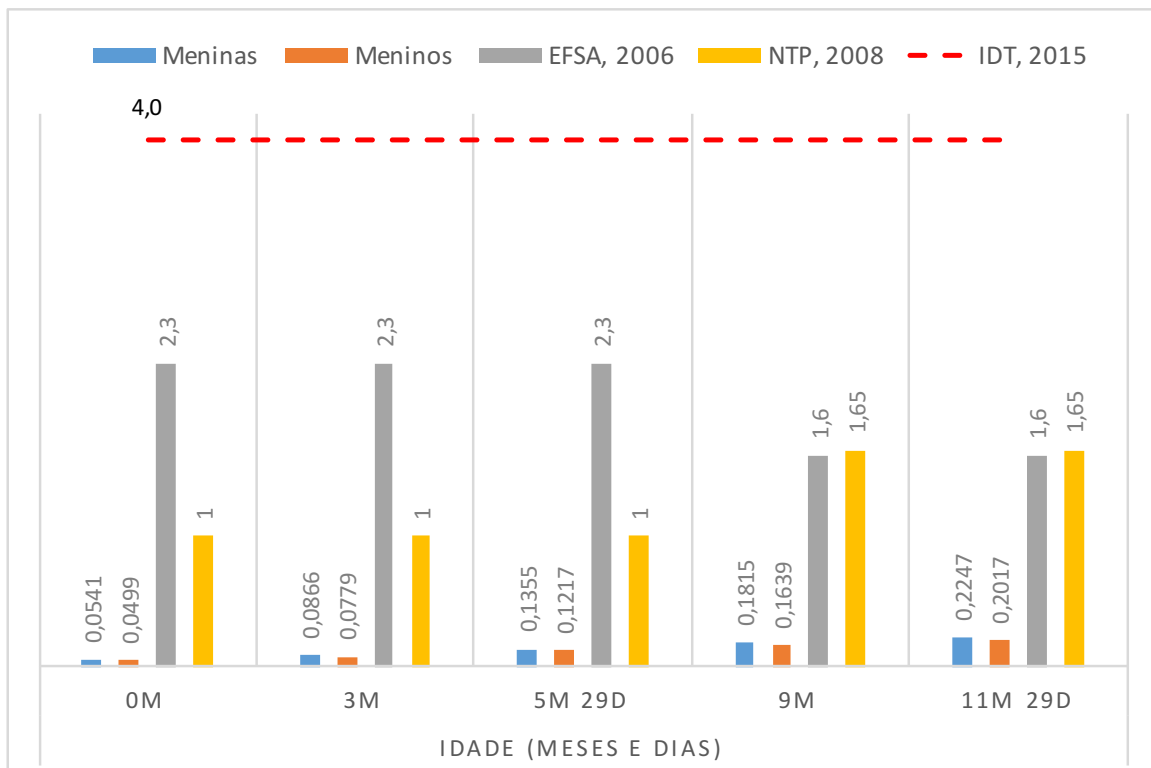
Na faixa etária compreendida entre 0 e 6 meses é preciso ressaltar que considerou-se a alimentação exclusiva por fórmula infantil e desconsiderou-se fontes de exposição como leite materno, onde trabalhos indicam concentrações de BFA oscilando entre 0,65 a 0,70 ng/mL (OTAKA et al., 2003); 0,28 a 0,97 ng/mL (SUN et al, 2004); 1,1 ng/mL (Ye et al., 2006). O aleitamento materno exclusivo reduziria a exposição dietética ao BFA nessa faixa etária, enquanto a alimentação por fórmulas infantis enlatadas resultam em incremento nos níveis de exposição dietética de lactentes.

Na faixa etária compreendida entre 6 e 12 meses incompletos, considerou-se a alimentação exclusiva por fórmula infantil. Demais fontes de exposição como leite materno, água (RODRIGUEZ-MOZAZ et al., 2004) e alimentos introduzidos à dieta, como frutas e vegetais (GOODSON ET AL, 2002; THOMSON e GROUNDS, 2005; BRAUNRATH e CICHNA, 2005) não contribuíram para as estimativas de exposição ao BFA no presente trabalho.

Os valores exposição dietética média ao BFA, por faixa e sexo, foram apresentados na figura 12 e comparados com estimativas disponibilizadas pela EFSA (2006) e NTP (2008). Apesar da supressão de fontes de exposição dietéticas que resultariam em menores valores de exposição ao BFA, as estimativas calculadas e baseadas numa alimentação restrita a fórmulas infantis foram acentuadamente inferiores aqueles sugeridos pela comunidade científica. As razões podem ser encontradas pela adoção de pressupostos ou informações em literatura científica diversa da utilizada no presente estudo. Por exemplo, as

estimativas de exposição dietética ao BFA para a faixa de 0 a 6 meses obtidas pela EFSA (2006) e NTP (2008) foram baseadas em estudos onde concentrações de BFA de fórmulas infantis eram da ordem de 45-113  $\mu\text{g}/\text{kg}$  e 6,6  $\mu\text{g}/\text{L}$ , bem superiores aos resultados encontrados nas fórmulas infantis analisadas.

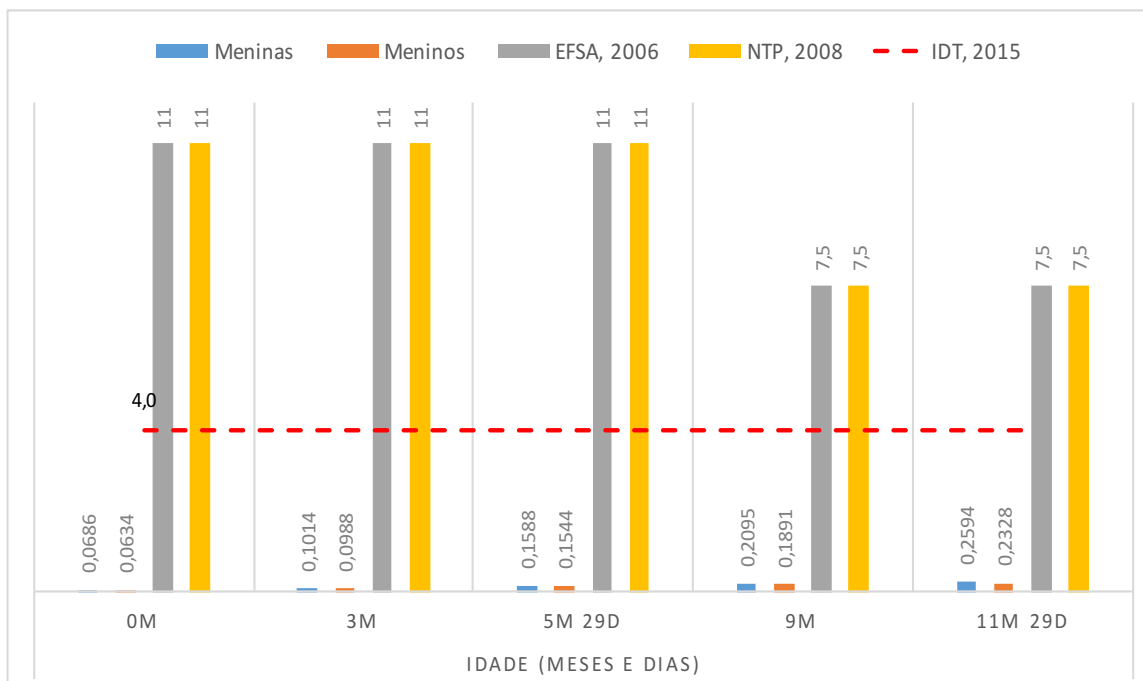
Figura 12 – Comparativo entre as estimativas de exposição dietética média calculadas e estabelecidas pela EFSA (2006) e NTP (2008), em  $\mu\text{g}/\text{kg}$  p.c/dia



Além disso, na faixa de 6 a 12 meses, a estimativa de exposição ao BFA determinada pelo NTP (2008) considerou o consumo de 0,38 kg de alimentos enlatados com concentrações de BFA próximas a 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de alimento. Esses aspectos combinados proporcionam valores estimados de exposição distintos.

O acondicionamento das fórmulas infantis em mamadeiras de PC produziram concentrações de BFA superiores e o fato refletirá nos valores de exposição dietética média calculados ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  p.c/dia). Tais números, por faixa e sexo, foram apresentados na figura 13 e comparados com estimativas disponibilizadas pela EFSA (2006) e NTP (2008).

Figura 13 - Comparativo entre as estimativas de exposição dietética média calculadas e estabelecidas pela EFSA (2006) e NTP (2008) após contato das fórmulas infantis com mamadeiras de policarbonato, em  $\mu\text{g}/\text{kg p.c}/\text{dia}$



Importante destacar que a NTP (2008) adota os mesmos valores preconizados pela EFSA (2006) na situação mencionada para as faixas etárias, ou seja, a ingestão de fórmulas infantis após contato com materiais de PC.

Os resultados indicam e confirmam os métodos conservadores adotados pela comunidade científica no que tange o estabelecimento de estimativas de exposição dietética ao BFA. No pior cenário selecionado, a estimativa de exposição obtida por faixa etária e sexo nesse estudo encontra-se em níveis muito inferiores a ingestão diária tolerada (IDT) atual para o BFA, recentemente reduzida para  $4 \mu\text{g}/\text{kg p.c}/\text{dia}$  (EFSA, 2015).

Tal medida corrobora com a posição da EFSA em permanecer estimulando a necessidade de estudos de longa duração em ratos, especialmente relacionados a potenciais efeitos adversos sobre as glândulas mamárias, o metabolismo e sistemas imunológico e neuro comportamental, reduzindo incertezas existentes.

#### 4.5. Resultados do ensaio toxicológico

Os animais disponibilizados com peso médio de  $50,2 \pm 6,2$  g apresentaram ganho de peso aproximado de 3,0 g por dia. Foram administrados com as substâncias testadas até o 20º e 22º dia de nascimento, pois a maturação sexual



das ratas ocorre, aproximadamente, no 25º dia. Apenas um óbito foi registrado quando administrado o BFA em dose de 600 mg/kg p.c.. As substâncias EE e FDD foram solubilizadas em óleo de milho, enquanto para o BFA, por sua natureza polar, foi preparada uma suspensão em 10% de etanol em água. A dificuldade de solubilização de algumas substâncias estrogênicas ou relacionadas é destacada pelo protocolo nº 440 da OECD (2007). A diretriz orienta preferencialmente a solubilização/suspensão em água, porém, reconhece a natureza hidrofóbica de substâncias com as características acima e a necessidade de adequação, principalmente, com óleo ou outro veículo como etanol. A solubilização do BFA inicialmente realizada em etanol 99% foi seguida de diluição em água para a obtenção de uma suspensão aquosa contendo 10% de etanol.

As respostas obtidas de contração uterina induzidas *in vitro* pela ocitocina foram registradas e a intensidade do efeito produzida determinada pela medida dos picos em mm. Na análise dos dados pelo GraphPad Prism empregou-se a regressão não linear e o modelo de curva sigmóide (inclinação variável) obtida plotando-se o log da concentração de ocitocina (mU/mL) versus a resposta visando as determinações dos parâmetros de  $E_{max}$  (*plateau superior*),  $CE_{50}$ , R e inclinação. Somente quando foi possível encontrar os valores de melhor ajuste para estes parâmetros na curva com precisão foi efetuada a transformação da resposta original de mm de contração para o percentual de efeito máximo ( $\%E_{máx}$ ) de cada ensaio. Antes da transformação, valores de y (contração em mm) foram interpolados para cada valor de concentração de ocitocina a partir da sigmóide, através do programa GraphPad Prism e a resposta em % de  $E_{max}$  calculada em relação ao valor de  $E_{max}$  já obtido. Esta opção diminui a variabilidade entre as respostas de diferentes ensaios realizados sendo particularmente importante ao se combinar os ensaios.

As intensidades de efeito determinadas pela medida dos picos de contração uterina, em mm, por ensaio realizado, bem como, os respectivos valores de  $\%E_{máx}$  calculados quando aplicáveis são mostrados nas Tabelas 13 a 18.

A Tabela 13 mostra dois animais submetidos aos procedimentos do ensaio, porém não administrados por via oral com qualquer substância (controle sem tratamento), apresentaram resultados compatíveis com respostas esperadas para um animal sexualmente imaturo, ou seja, sem produção endógena de estrógeno evidenciado pela insensibilidade da preparação uterina *in vitro* às concentrações crescentes de ocitocina na faixa de concentrações de 0,005 a 200 mU/mL. Resultados semelhantes foram obtidos para o grupo administrado com óleo de milho

no qual houve ausência de resposta de contração uterina para três animais e respostas de contração uterina que não permitiram a construção de curvas concentração-resposta de melhor ajuste e cálculo dos parâmetros. A análise estatística dos dados mostrou valores de erro padrão e intervalo de confiança 95% da  $CE_{50}$  e  $E_{max}$  com amplitude elevada ou coeficiente de correlação excessivamente reduzido.

A Tabela 14 mostra que para os animais pré-tratados pelo EE nas duas doses de 1 e 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  p.c foram obtidas curvas sigmóide concentração-resposta de melhor ajuste, o que permitiu a transformação dos dados originais em mm de contração uterina em % de  $E_{max}$ . Ao se combinar os resultados dos ensaios realizados com os dados (contração uterina em mm e % de  $E_{max}$ : Figura 14) observou-se que ambas as doses de EE induziram a estimulação de receptores de ocitocina no útero quando comparadas ao controle óleo de milho que mostrou ausência de efeito como mostrado na Tabela 13. Ao se comparar os valores obtidos para os 3 parâmetros ( $E_{max}$ ,  $CE_{50}$  e inclinação) dos ensaios *in vitro* de contração uterina pela ocitocina entre as preparações provenientes de animais pré-tratados com 1 e 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de  $E_{max}$  ( $p=0,7325$ ) e inclinação ( $p=0,1260$ ), porém os valores de  $CE_{50}$  foram considerados estatisticamente significativos ( $p=0,0478$ ) quando o efeito foi expresso em mm de contração uterina; para % de  $E_{max}$ , foram considerados iguais os valores de  $E_{max}$  ( $p=0,9911$ ) e  $CE_{50}$  ( $P=0,06$ ) e as inclinações foram diferentes ( $p=0,0021$ ). Os maiores valores de coeficiente de correlação (R) foram obtidos quando os resultados são expressos em % de  $E_{max}$ .

Tabela 13 – Respostas obtidas para os ensaios de contração uterina induzidas *in vitro* pela ocitocina em ratas imaturas não tratadas (controle sem tratamento) e pré-tratadas por 3 dias consecutivos com óleo de milho por via oral

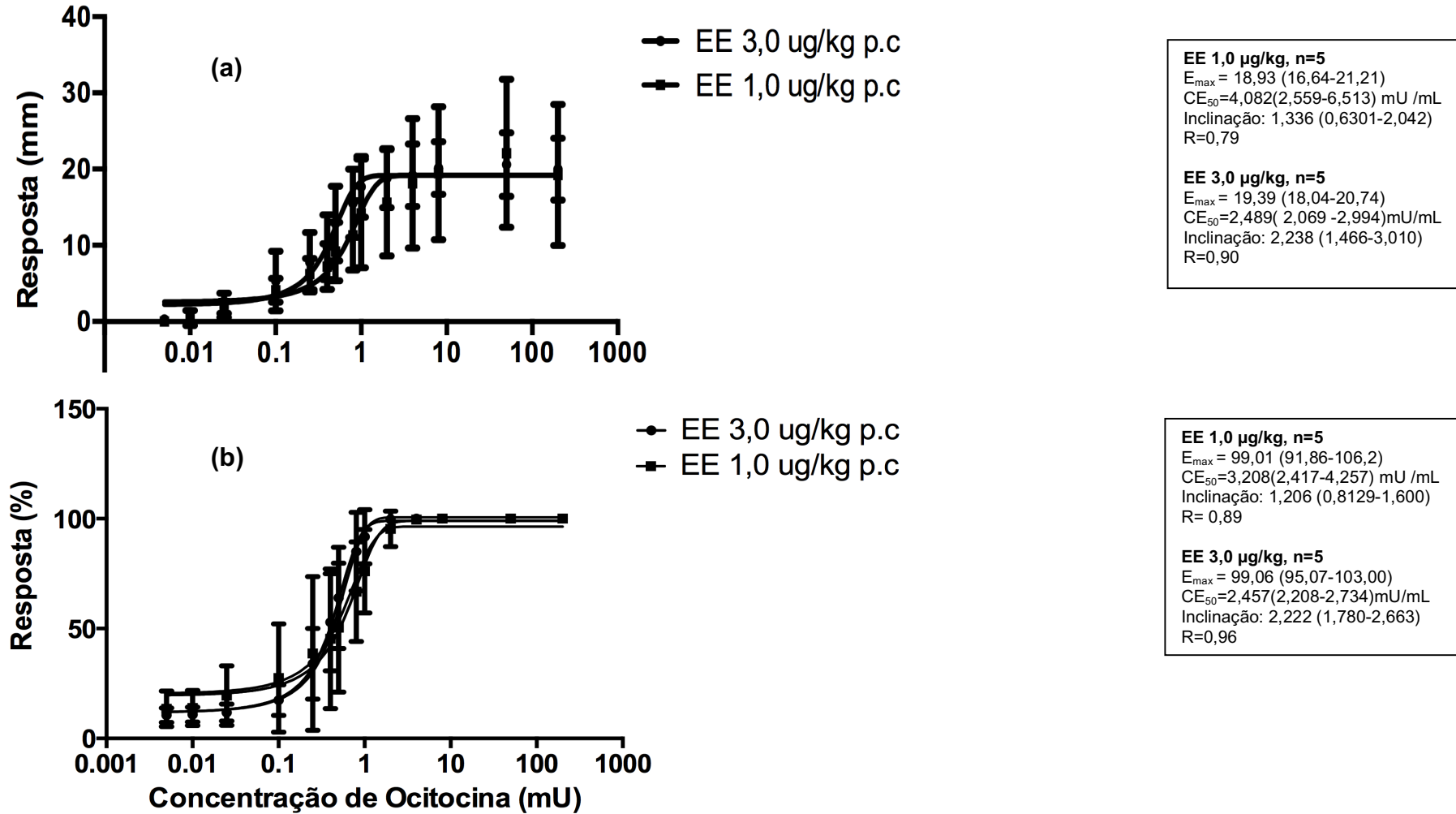
Concentração de Ocitocina (mU/mL)	Efeito (contração uterina em mm) / % E <sub>máx</sub>							
	Controle sem tratamento		Óleo de Milho					
	1	2	1	2	3	4	5	6
0,005	0 / NA	0 / NA	0 / NA	0 / NA	1,0/NA	0 /NA	0 /NA	0 / NA
0,01	0 / NA	0 / NA	0 / NA	0 / NA	0/ NA	0 /NA	0 /NA	0 / NA
0,025	0 / NA	0 / NA	0 / NA	0 / NA	0/ NA	0 /NA	0 /NA	0 / NA
0,1	1 / NA	0 / NA	0 / NA	0 / NA	2,0/ NA	0 /NA	1,0 /NA	0 / NA
0,25	0 / NA	0 / NA	0 / NA	0 / NA	1,0/ NA	0 /NA	0,9 /NA	0 / NA
0,4	0 / NA	0 / NA	0 / NA	0 / NA	0/ NA	0 /NA	1,4 /NA	0 / NA
0,5	0 / NA	0 / NA	0 / NA	0 / NA	2,0/ NA	0 /NA	1,7 /NA	0 / NA
0,8	0 / NA	0,3 / NA	0 / NA	0 / NA	2,5/ NA	3,0 /NA	2,0 /NA	0 / NA
1,0	0 / NA	0 / NA	0 / NA	0 / NA	2,0/ NA	3,0 /NA	1,9 /NA	0 / NA
2,0	0 / NA	0 / NA	0 / NA	0 / NA	2,8 /NA	4,0 /NA	2,5 /NA	0 / NA
4,0	0 / NA	0 / NA	0 / NA	0 / NA	2,6 /NA	4,0 /NA	2,8 /NA	0 / NA
8,0	0 / NA	0 / NA	0 / NA	0 / NA	3,4 /NA	4,0 /NA	2,8 /NA	0 / NA
50	0,5 / NA	0 / NA	0 / NA	0 / NA	1,8 /NA	4,0 /NA	3,0 /NA	1,0 / NA
200	0 / NA	0 / NA	0 / NA	0 / NA	1,0 / NA	1,8 /NA	2,7 /NA	0 / NA

Nota: Valores de % E<sub>max</sub> não aplicáveis (NA) em razão da impossibilidade da obtenção de curvas sigmóide de melhor ajuste pelo método dos mínimos quadrados e consequentemente de parâmetros, como E<sub>max</sub>, CE<sub>50</sub> e inclinação de precisão adequada.

Tabela 14 – Respostas obtidas para os ensaios de contração uterina induzidas *in vitro* pela ocitocina em ratas imaturas pré-tratadas por 3 dias consecutivos com 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE) por via oral

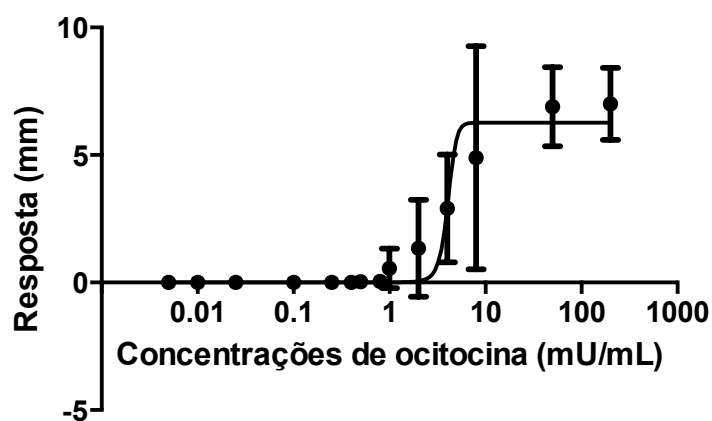
Concentração de Ocitocina (mU/mL)	Efeito (contração uterina em mm) / % E <sub>máx</sub>									
	EE 1,0 $\mu$ g/kg p.c					EE 3,0 $\mu$ g/kg p.c				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
0,005	0 / 11,4	0 / 27,2	0 / 9,7	0 / 13,0	0 / 5,9	1,4 / 14,0	0 / 14,1	0 / 8,5	0 / 10,1	0 / 7,0
0,01	0 / 13,0	0 / 27,3	0 / 9,9	2,2 / 13,3	0 / 6,0	1,0 / 14,3	0 / 14,6	0 / 8,6	0 / 10,3	0 / 7,2
0,025	2,6 / 19,0	4,2 / 27,7	1,2 / 10,4	2,9 / 13,9	1,0 / 6,3	2,0 / 15,2	2,0 / 16,4	0 / 9,0	2,8 / 11,0	1,1 / 8,0
0,1	4,5 / 69,3	5,2 / 29,6	3,9 / 20,8	5,4 / 17,7	1,5 / 7,8	4,0 / 20,8	12,2 / 27,8	2,6 / 11,3	4,6 / 15,2	3,2 / 13,0
0,25	5,7 / 99,5	6,5 / 33,5	7,9 / 31,1	8,0 / 27,6	2,9 / 11,9	6,0 / 35,8	14,3 / 59,7	4,4 / 17,2	8,0 / 27,3	6,0 / 30,8
0,4	6,0 / 100	6,5 / 37,7	8,0 / 39,3	11,8 / 40,3	3,7 / 17,7	8,0 / 54,3	17,0 / 85,1	5,8 / 25,5	9,0 / 44,0	9,0 / 57,0
0,5	6,2 / 100	6,8 / 40,6	11,0 / 65,7	15,1 / 49,7	6,8 / 22,7	10,2 / 66,3	19,5 / 93,3	6,5 / 32,2	15,0 / 56,2	13,0 / 73,2
0,8	7,0 / 100	7,4 / 49,6	15,1 / 79,8	17,0 / 75,6	10,0 / 42,7	12,3 / 89,9	22,3 / 99,5	10,9 / 56,2	17,0 / 84,9	15,0 / 96,0
1,0	5,8 / 100	8,1 / 55,7	19,9 / 99,3	22,2 / 86,9	14,9 / 58,1	14,3 / 96,0	21,9 / 99,9	14,0 / 71,3	22,0 / 93,8	16,2 / 99,0
2,0	7,4 / 100	9,0 / 81,0	20,1 / 100	23,1 / 99,7	18,4 / 96,9	15,0 / 99,9	23,0 / 100	16,0 / 98,6	23,0 / 100	17,0 / 100
4,0	7,3 / 100	11,5 / 98,0	24,4 / 100	27,3 / 100	20,2 / 100	15,4 / 100	24,0 / 100	16,1 / 100	23,3 / 100	17,2 / 100
8,0	7,8 / 100	12,6 / 100	24,1 / 100	28,0 / 100	24,8 / 100	15,6 / 100	23,0 / 100	21,0 / 100	23,5 / 100	17,6 / 100
50	7,9 / 100	16,0 / 100	29,0 / 100	29,8 / 100	27,7 / 100	14,8 / 100	23,3 / 100	24,0 / 100	23,4 / 100	17,5 / 100
200	5,6 / 100	14,0 / 100	26,8 / 100	22,6 / 100	27,1 / 100	14,3 / 100	22,8 / 100	23,0 / 100	22,9 / 100	17,0 / 100

Figura 14 – Efeito do pré-tratamento de ratas Wistar pelo 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE) nas contrações uterinas induzidas *in vitro* pela ocitocina (n=5). Respostas em (a) contração uterina em mm; (b) percentual do efeito máximo, % E<sub>máx</sub>

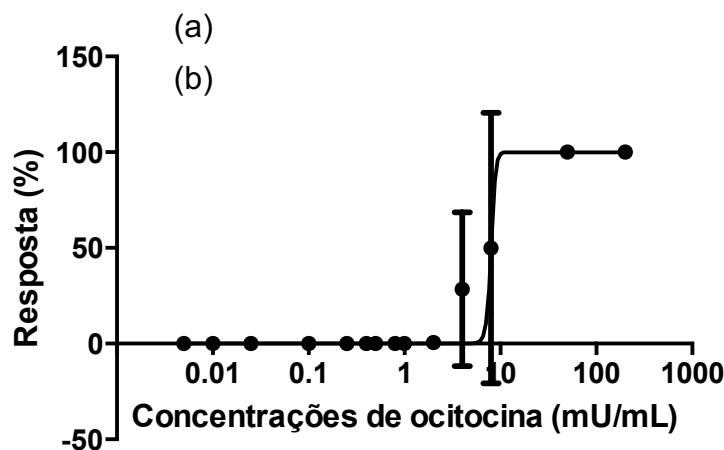


A Tabela 15 mostra que para os animais pré-tratados pelo FDD na dose de 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  p.c, semelhante ao que ocorreu para os animais controle sem tratamento e pré-tratados com óleo de milho, para 4 animais não se pode obter uma sigmóide de melhor ajuste devido à ausência de uma regressão adequada log concentração versus efeito sendo que para um animal houve ausência de efeito na faixa de concentrações testada da ocitocina. Somente para dois animais foi possível a obtenção das curvas sigmóides de melhor ajuste e consequentemente a transformação dos dados de contração uterina em mm para % de  $E_{\text{max}}$  (Figura 15). Para ambos tipos de representação, os valores de  $CE_{50}$  obtidos a partir da combinação dos dois ensaios mostra um valor muito superior aos valores encontrados para o controle positivo EE e com um limite confiança 95% extremamente amplo. Consequentemente, demonstramos praticamente ausência de efeito de estimulação de receptores de ocitocina no útero de animais pré-tratados com FDD 1000mg/kg comparável ao efeito obtido para o seu controle-solvente (óleo de milho).

Figura 15 – Efeito do pré-tratamento de ratas Wistar pelo ftalato de dibutila (FDD) nas contrações uterinas induzidas *in vitro* pela ocitocina (n=2). Respostas em (a) contração uterina em mm; (b) percentual do efeito máximo, %  $E_{\text{máx}}$



**FDD 1000 mg/kg p.c, n=2**  
 $E_{\text{max}} = 6,264 (5,197-7,330)$   
 $CE_{50} = 4,051 (3304-38345)$  mU /mL  
 Inclinação: Não disponível  
 $R = 0,90$



**FDD 1000 mg/kg p.c, n=2**  
 $E_{\text{max}} = 100 (81,7-118,3)$   
 $CE_{50} = 9,997 \times 10^7 (3,335 \times 10^7 - 2,997 \times 10^7)$   
 mU /mL  
 Inclinação: Não disponível  
 $R = 0,90$

Tabela 15 – Respostas obtidas para os ensaios de contração uterina induzidas *in vitro* pela ocitocina em ratas imaturas pré-tratadas por 3 dias consecutivos com o ftalato de dibutila (FDD) 1000 mg/kg p.c., por via oral

Concentração de Ocitocina (mU/mL)	Efeito (contração uterina em mm) / % E <sub>máx</sub>					
	Controle negativo, FDD 1000 mg/kg p.c					
	1	2	3	4	5	6
0,005	0 / NA	0/ 0,0	0/ NA	0/ NA	0/ 3,5	0/ 2,0
0,01	0 / NA	0/ 0,0	0/ NA	0/ NA	0/ 3,5	0/ 2,1
0,025	0 / NA	0/ 0,0	0/ NA	0/ NA	0/ 3,6	0/ 2,1
0,1	0 / NA	0/ 0,0	0/ NA	0/ NA	0/ 3,8	0/ 2,1
0,25	0 / NA	0/ 0,0	0/ NA	0/ NA	0/ 4,4	0/ 2,3
0,4	0 / NA	0/ 0,0	0/ NA	0/ NA	0/ 5,0	0/ 2,4
0,5	0,05/ NA	0/ NA	0/ NA	0/ NA	0,05/5,5	0/ 2,5
0,8	1,0/ NA	3,0/ NA	0/ NA	0/ NA	0,08/7,1	0/ 2,8
1,0	3,8/ NA	3,5/ NA	0/ NA	0/ NA	1,1/ 8,4	0/ 3,0
2,0	2,8/ NA	3,5/ NA	0/ NA	0/ NA	2,7/18,8	0/ 4,4
4,0	4,0/ NA	4,0/ NA	0/ NA	0,05/ NA	4,4/59,7	1,4/ 9,2
8,0	4,0/ NA	4,2/ NA	0/ NA	1,0 / NA	8,0/98,4	1,8/33,0
50	1,8/ NA	4,2/ NA	0/ NA	1,0 / NA	8,0/100	5,8/ 100
200	0 / NA	2,0/ NA	0/ NA	0 / NA	8,0/100	6,0/ 100

Nota: Nota: Valores de % E<sub>max</sub> não aplicáveis (NA) em razão da impossibilidade da obtenção de curvas sigmóide de melhor ajuste pelo método dos mínimos quadrados e conseqüentemente de parâmetros, como E<sub>max</sub>, CE<sub>50</sub> e inclinação de precisão adequada.

A Tabela 16 mostra que para os animais pré-tratados pelo etanol 10% foram obtidas curvas sigmóide concentração-resposta de melhor ajuste para 5 ensaios, enquanto para o BFA 300 e 600 mg/kg (Tabelas 17 e 18) foram obtidas respectivamente 6 e 9 sigmóides de melhor ajuste o que permitiu a transformação dos dados originais em mm de contração uterina em % de  $E_{max}$ . Ao se combinar os resultados dos ensaios realizados com os dados (contração uterina em mm e % de  $E_{max}$ ) observou-se que para as doses de 300 e 600 mg/kg BFA não houve diferença significativa entre os valores médios obtidos de  $CE_{50}$  ( $p > 0,6$ ) e inclinação ( $p > 0,3$ ) quando comparado ao controle-solvente etanol 10% (Figuras 16 e 17). No entanto, diferenças significativas foram somente detectadas para os valores de  $E_{max}$  para as doses de 300 mg/kg de BFA ( $p = 0,0001$ ) e de 600 mg/kg ( $p = 0,0011$ ) quando comparado ao etanol 10% mas somente quando o efeito é expresso em contração uterina em mm, não se detectando tal diferença quando o efeito é expresso em % de  $E_{max}$  para o BFA 300 mg/kg ( $p = 0,5085$ ) e BFA 600 mg/kg ( $p = 0,2226$ ). Sendo os valores de  $CE_{50}$  estatisticamente equivalentes entre os animais controle e pré-tratados com BFA, a potência da ocitocina de ambas preparações uterinas não diferem. Observa-se que os valores de  $E_{max}$  ou respostas máximas produzidas pelo BFA 300 e 600 mg/kg foram, respectivamente, 2,4 X e 2,5X superiores aos obtidos para o etanol 10%, e conseqüentemente a eficácia da ocitocina foi superior em animais pré-tratados pelo BFA. Não foram detectadas também diferenças significativas entre os valores de  $E_{max}$  ( $p > 0,6$ ) e  $CE_{50}$  ( $p > 0,08$ ) se comparadas as respostas das preparações provenientes de animais tratados com as duas doses de BFA (Figura 17).



Tabela 16 – Respostas obtidas para os ensaios de contração uterina induzidas *in vitro* pela ocitocina em ratas imaturas pré-tratadas por 3 dias consecutivos com etanol 10% em água por via oral

Concentração de Ocitocina (mU/mL)	Efeito (contração uterina em mm) / % E <sub>máx</sub>							
	Etanol <sub>(aq)</sub> 10%							
	1	2	3	4	5	6	7	8
0,005	0/ 5,4	0/ 3,9	0/ 0,0	0/ 12,9	0/ NA	0/ NA	0/ NA	0/ 8,6
0,01	0/ 5,6	0/ 3,9	0/ 0,0	0/ 13,1	0/ NA	0/ NA	0/ NA	0/ 8,9
0,025	0/ 6,4	0/ 4,0	0/ 0,00	0/ 13,8	0/ NA	0/ NA	0/ NA	0/ 9,9
0,1	0/ 12,2	0/ 4,6	2,3/ 39,4	1,0/ 17,6	0/ NA	0/ NA	0/ NA	1,0/ 16,5
0,25	7,5/ 36,0	0/ 5,9	5,1/ 100	4,0/ 27,8	0/ NA	0/ NA	0/ NA	5,0/ 98,1
0,4	10,0/ 69,5	0/ 7,6	5,4/ 100	5,0/ 41,0	0/ NA	0,4/ NA	0/ NA	5,8/ 67,4
0,5	11,0/ 85,3	0/ 8,9	5,0/ 100	5,0/ 50,7	0/ NA	0,3/ NA	0/ NA	5,9/ 81,9
0,8	11,2/ 99,0	0/ 14,3	6,4/ 100	4,7/ 76,9	0/ NA	0,3/ NA	0/ NA	7,0/ 97,9
1,0	13,2/ 99,9	2,0/ 19,2	5,6/ 100	7,6/ 87,9	6,2/ NA	0,3/ NA	0,5/ NA	7,0/ 99,6
2,0	12,8/ 100,0	1,8/ 58,4	6,0/ 100	8,0/ 99,7	6,0/ NA	0,4/ NA	0,8/ NA	8,1/ 100
4,0	14,6/ 100,0	3,4/ 98,0	6,2/ 100	9,0/ 100	6,8/ NA	1,5/ NA	1,0/ NA	9,3/ 100
8,0	15,0/ 100,0	3,3/ 100	6,4/ 100	9,0/ 100	7,2/ NA	1,4/ NA	1,0/ NA	9,3/ 100
50	16,2/ 100,0	3,4/ 100	6,3/ 100	9,0/ 100	6,0/ NA	0,5/ NA	1,0/ NA	9,3/ 100
200	18,5/ 100,0	4,4/ 100	6,0/ 100	9,0/ 100	3,8/ NA	0,3/ NA	0,5/ NA	9,3/ 100

Nota: Valores de % E<sub>max</sub> não aplicáveis (NA) em razão da impossibilidade da obtenção de curvas sigmóide de melhor ajuste pelo método dos mínimos quadrados e consequentemente de parâmetros, como E<sub>max</sub>, CE<sub>50</sub> e inclinação de precisão adequada.

Tabela 17 - Respostas obtidas para os ensaios de contração uterina induzidas *in vitro* pela ocitocina em ratas imaturas pré-tratadas por 3 dias consecutivos com bisfenol A (BFA) 300 mg/kg p.c, por via oral

Concentração de Ocitocina (mU/mL)	Altura (mm) / E <sub>máx</sub> (%)							
	BFA 300 mg/kg p.c							
	1	2	3	4	5	6	7	8
0,005	0/5,8	0/ 9,0	0/ 6,4	0/9,2	0/7,8	0/8,3	0/ 9,1	0/ 11,6
0,01	0/5,8	0/ 9,2	0/ 6,7	0/9,4	0/8,3	0/8,5	0/ 9,2	0/ 11,7
0,025	0/5,9	0/ 9,6	1,0/ 7,7	0/10,2	1,0/9,9	0/9,1	0/ 9,7	0/ 12,1
0,1	0/6,3	1,0/ 11,7	2,4/ 15,5	1,2/15,2	3,0/22,5	0,8/12,6	0,5/12,2	0,8/ 14,3
0,25	0/7,3	5,2/ 17,4	29,8/ 46,7	6,1/30,8	6,5/67,1	4,3/23,0	3,0/19,1	2,0/ 19,6
0,4	0/8,4	10,6/ 24,9	32,5/ 80,8	7,1/52,4	8,7/93,4	3,5/38,1	3,0/28,6	2,5/ 26,3
0,5	0/9,2	12,0/ 31,1	35,0/ 92,3	9,0/66,8	9,0/98,1	7,3/50,0	5,1/36,2	3,0/ 31,5
0,8	2,0/12,1	14,0/ 53,0	39,0/ 99,6	9,8/92,5	9,1/100	8,7/81,0	6,0/62,0	4,0/ 49,7
1,0	3,0/14,5	18,8/ 67,5	39,9/ 99,9	10,0/97,6	9,2/100	8,8/91,8	7,2/76,7	4,0/ 62,1
2,0	4,8/32,0	20,7/ 97,8	38,6/ 100,0	11,1/100	9,8/100	10,0/99,9	7,7/99,2	5,7/ 95,4
4,0	7,7/78,4	26,6/ 100,0	45,5/ 100,0	12,9/100	10,0/100	10,0/100	8,7/100	6,0/ 100
8,0	9,2/99,6	31,3/ 100,0	48,9/ 100,0	14,5/100	10,5/100	12,0/100	10,5/100	8,0/ 100
50	12,8/100	31,5/ 100,0	53,5/ 100,0	14,9/100	10,0/100	13,2/100	12,0/100	8,0/ 100
200	11,4/100	30,7/ 100,0	54,8/ 100,0	14,9/100	10,0/100	13,0/100	12,0/100	8,0/ 100

Figura 16 - Efeito do pré-tratamento de ratas Wistar pelo bisfenol A (BPA) 300 e 600 mg/kg p.c em relação ao etanol 10% por via oral nas contrações uterinas induzidas *in vitro* pela ocitocina. Respostas em (a e c) contração uterina em mm; (b e d) percentual do efeito máximo, %  $E_{\max}$

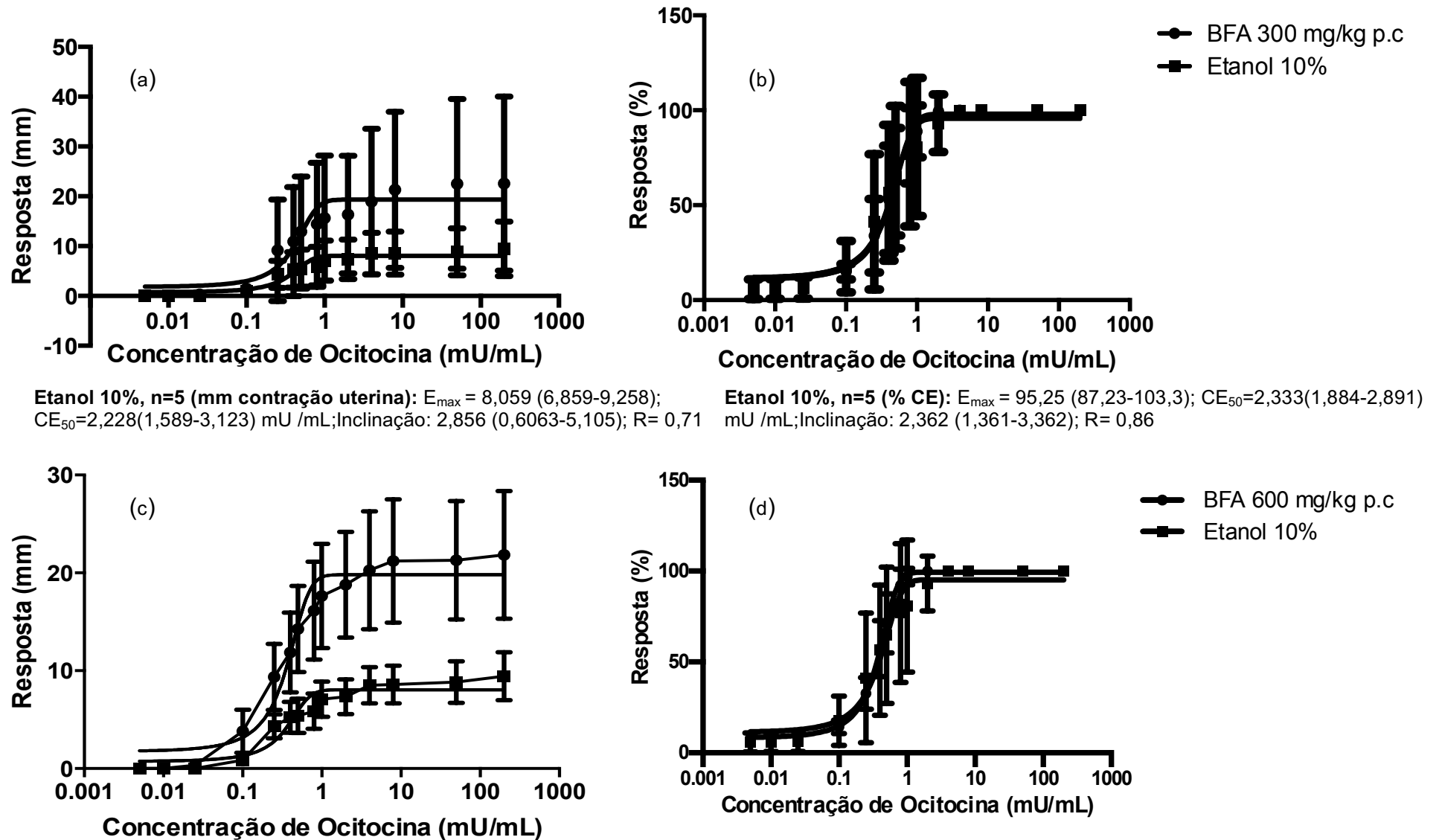
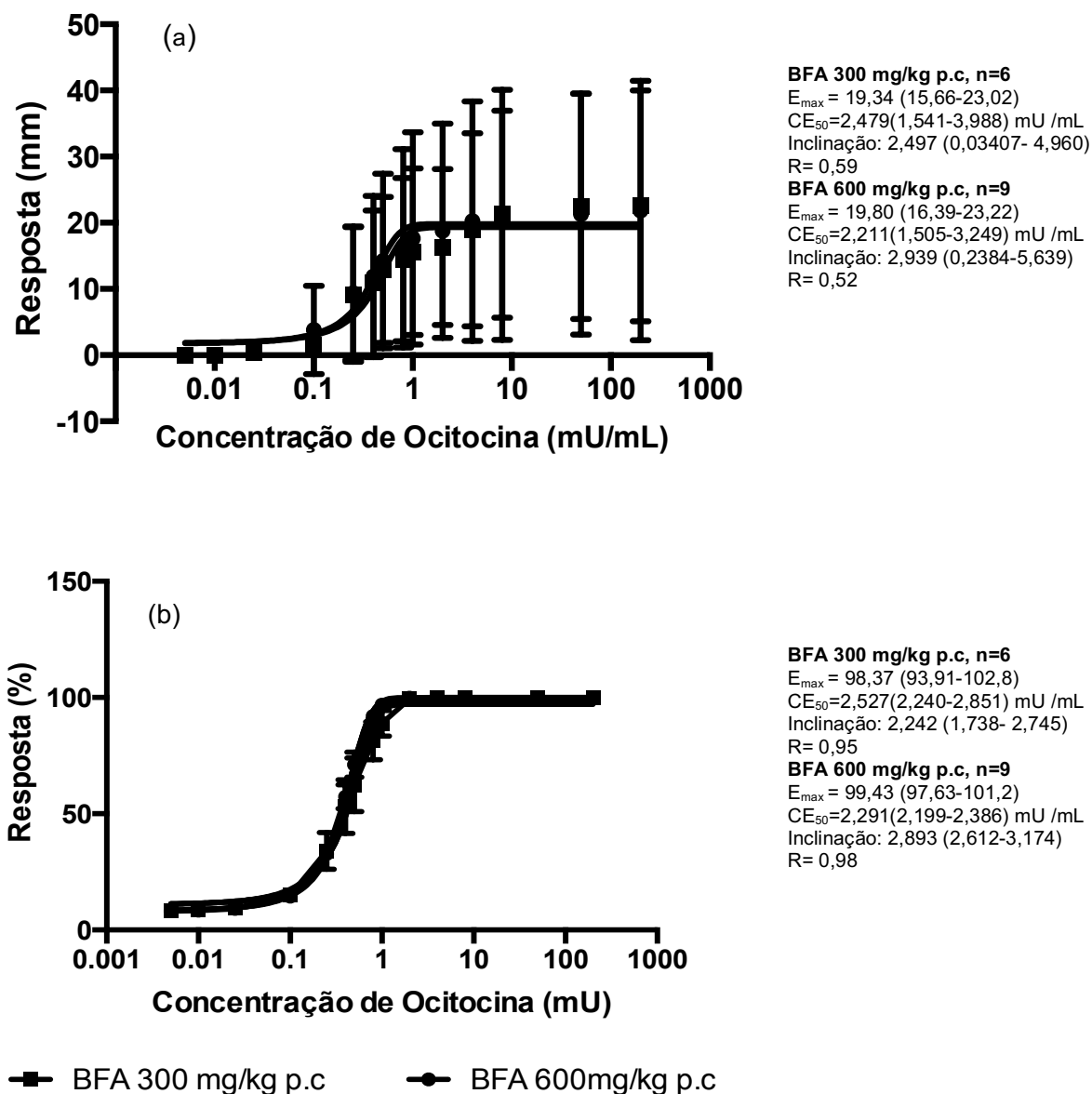


Tabela 18 - Respostas obtidas para os ensaios de contração uterina induzidas *in vitro* pela ocitocina em ratas imaturas pré-tratadas por 3 dias consecutivos com bisfenol A (BFA) 600 mg/kg p.c, por via oral

Concentração de Ocitocina (mU/mL)	Efeito (contração uterina em mm) / % de E <sub>máx</sub>								
	BFA 600 mg/kg p.c								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0,005	0/ 4,6	0/ 11,0	0/9,9	0/10,6	0/ 4,7	0/ 5,3	0/10,4	0/9,8	0/6,5
0,01	0/ 4,8	0/ 11,4	0/10,1	0/10,9	0/ 4,9	0/ 5,5	0/10,6	0/10,0	0/6,7
0,025	0/ 5,5	1,1/ 12,6	2,0/10,9	0/11,9	0/ 5,7	0/ 6,0	0/11,2	0/10,6	0/7,7
0,1	0/ 9,9	20,0/ 20,8	8,8/15,8	2,6/18,4	0/ 11,7	0,5/ 9,5	1,0/14,9	1,0/14,0	0,5/14,3
0,25	10,0/ 28,3	34,3/46,4	14,6/30,5	6,0/38,2	4,0/ 38,5	2,2/ 22,4	3,6/25,0	4,0/23,7	5,5/40,3
0,4	9,9/ 58,7	42,0/74,0	19,7/50,7	6,8/63,0	5,7/ 74,7	5,4/ 44,1	6,0/38,8	4,5/37,2	6,7/73,2
0,5	17,9/ 77,0	45,0/86,3	24,3/64,4	8,0/77,0	5,9/ 89,3	8,1/ 60,7	6,7/49,3	5,4/47,7	7,0/87,4
0,8	18,7/ 97,7	50,0/98,5	30,6/90,8	8,5/96,2	6,3/ 99,5	8,1/ 92,1	7,9/77,9	7,1/76,8	8,0/99,1
1,0	21,3/ 99,6	52,0/99,7	35,8/96,8	8,9/99,0	6,1/ 99,9	9,0/ 97,8	8,6/89,3	8,6/88,7	8,5/99,9
2,0	24,7/ 100,0	53,5/100	36,0/100	10,2/100	7,0/ 100,0	10,0/ 100,0	9,1/99,8	9,7/99,9	8,8/100
4,0	21,8/ 100,0	61,2/100	38,4/100	11,1/100	8,0/ 100,0	11,4/ 100,0	11,1/100	10,1/100	9,3/100
8,0	21,9/ 100,0	64,7/100	39,0/100	12,2/100	8,5/ 100,0	12,0/ 100,0	12,0/100	10,5/100	10,0/100
50	20,5/ 100,0	63,0/100	39,1/100	12,3/100	9,2/ 100,0	13,1/ 100,0	13,3/100	11,1/100	10,0/100
200	20,4/ 100,0	68,0/100	38,9/100	12,2/100	9,0/ 100,0	13,0/ 100,0	13,1/100	11,0/100	11,0/100

Figura 17 - Efeito do pré-tratamento de ratas Wistar pelo BFA 300 (n=6) e 600 mg/kg p.c (n=9) nas contrações uterinas induzidas *in vitro* pela ocitocina. Respostas em (a) contração uterina em mm; (b) percentual do efeito máximo, %  $E_{\max}$



Diante dos resultados apresentados, pode-se comparar o ensaio toxicológico proposto com o bioensaio uterotrófico protocolado, afinal ambos propõem-se a avaliar estrogénicidade de substâncias (OECD, 2007). Obviamente, o estudo foi conduzido de forma a permitir tal comparação, reproduzindo as condições semelhantes de ensaio (substâncias teste, doses utilizadas, número e espécie de animais, via de administração, controles) desenvolvido por Kanno et al. (2003). No bioensaio uterotrófico, o aumento significativo de peso do útero foi observado em animais imaturos tratados, via oral, com EE 1,0 (LOAEL) e 3,0  $\mu\text{g/kg p.c}$  ( $p < 0,05$ ). O

trabalho afirma ainda a menor variabilidade de respostas em ratas ovariectomizadas e ressalta menor sensibilidade por via oral em relação a via subcutânea. As respostas de contração uterina experimentadas no ensaio proposto também indicaram associação positiva entre animais imaturos tratados com EE, em ambas as doses e sob condições similares. Como perspectiva futura, pode-se proceder a redução da menor dose administrada com vistas a comparação de sensibilidade entre os ensaios abordados.

Nos ensaios onde se administraram substâncias estrogênicas consideradas fracas, ambos estudos apresentaram limitações. A elevação do peso do útero na maior dose de BFA administrada, 600 mg/kg p.c, foi considerada muito fraca, não ultrapassando valor relativo de 1,50. Entre os participantes do estudo interlaboratorial, quatro de um total de dez laboratórios não apresentaram diferença significativa entre os animais imaturos testados com BFA 600 mg/kg p.c. Foram registrados um óbito em pelo menos quatro laboratórios. No ensaio proposto, não detectou-se diferença significativa de potência de ocitocina induzida pelo BFA nas duas doses de 300 e 600 mg/kg, quando comparado ao etanol 10%. Pode-se afirmar que o BFA ocasionou maior eficácia da ocitocina sobre o útero. Demonstrou-se praticamente a total ausência de efeito de estimulação de receptores de ocitocina no útero de animais pré-tratados com FDD 1000 mg/kg comparável ao efeito obtido para o seu controle-solvente (óleo de milho). No tratamento com FDD 1000 mg/kg p.c pelo bioensaio uterotrófico, cinco entre trinta e seis laboratórios relataram pesos uterinos estatisticamente diferentes dos controles, indicando uma certa taxa de falsos positivos e negativos. Três conjuntos de resultados foram estatisticamente maiores do que os controles de solvente, uma taxa de falso positivo da ordem de 8%, e dois foram estatisticamente menores. O fato pode ser explicado pela reduzida amplitude de intervalos de confiança 95%, com limites superior e inferior próximos. Em termos absolutos, o aumento relativo médio do peso uterino nestes três incidentes foi ligeiramente inferior a 40% e sugere uma fonte de variabilidade do peso uterino entre grupos.

## 5. Conclusão

- O método analítico para determinação de BFA em fórmulas infantis mostrou-se sensível e adequado ao propósito. A possibilidade de contaminação foi minimizada pela adoção de práticas experimentais adequadas.
- Os resultados analíticos obtidos permitem concluir que a quantidade de BFA presente nas fórmulas infantis antes e após acondicionamento em mamadeiras de PC foram inferiores ao limite de migração específica vigente para a substância de 0,6 mg/kg de alimento. Embora proibida a comercialização de mamadeiras de PC no âmbito nacional e europeu, os ensaios de migração com fórmulas infantis produziram resultados estatisticamente relevantes após acondicionamento nos materiais de PC ( $\alpha=0,05$ ). A existência e comercialização de diversos recipientes e utensílios constituídos de PC deve ser considerado e monitorado com vistas a minimização de exposição ao BFA.
- Nas faixas etárias estudadas e baseado na concentração de BFA presente nas amostras analisadas, as estimativas de exposição dietética ao BFA indicaram níveis dez vezes inferiores aos calculados pelo NTP (2008) e cinquenta vezes inferiores ao EFSA (2006). Em relação ao IDT (EFSA, 2015), a exposição dietética ao BFA estimada no trabalho oscila entre valores de dezenove a oitenta vezes inferiores. 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 e frutas e vegetais. Baseando-se na literatura científica, a maior parcela de contribuição pode ser atribuída as fórmulas infantis, o que confere certa relevância aos valores de exposição do estudo.
- No entanto, essa conclusão não afasta a possibilidade de ocorrência de efeitos adversos sobre a saúde humana em decorrência da exposição ao BFA, mesmo em baixas doses, uma vez que o cenário é complexo e envolve outras possibilidades de exposição, não somente de origem dietética. E a comunidade científica tem manifestado, frequentemente, preocupação com o problema devido à existência de incertezas em relação aos dados e informações produzidos até momento. Há necessidade de desenvolvimento de estudos acerca dos potenciais efeitos adversos ocasionados pela exposição a baixas

doses de BFA, dentre os quais destacam-se: efeitos em glândulas mamárias e sistemas reprodutivo, metabólico, comportamental e imunológico.

- O ensaio toxicológico para a avaliação da estrogenicidade de substâncias pode ser considerado adequado ao propósito. A preparação isolada de útero de rata obtida de ratas imaturas com idade de 20 a 22 dias mostrou-se adequada para a detecção da estrogenicidade de substância de alta potência estrogênica como o EE, quando administrada por 3 dias consecutivos por via oral nas doses de 1 e 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  induzindo, respectivamente, valores médios de  $\text{CE}_{50}$  de 2,457 e 3,208 mU de ocitocina/mL (efeito expresso em % de  $E_{\text{max}}$ ). O controle negativo proposto FDD 1000 mg/kg quando administrado por via oral por 3 dias consecutivos induziu praticamente ausência de efeito estrogênico em útero com valor médio de  $\text{CE}_{50}$  extremamente elevado de  $9,9997 \times 10^7$  mU de ocitocina/mL (efeito expresso em % de  $E_{\text{max}}$ ). O não tratamento ou o pré-tratamento de ratas com óleo de milho, controle-solvente para o EE e o FDD, não estimulou os receptores de ocitocina na preparação uterina. O pré-tratamento dos animais pelo BFA, considerado uma substância fracamente estrogênica, nas doses de 300 e 600 mg/kg por 3 dias consecutivos, induziu, respectivamente, aumento das respostas máximas de ocitocina de 2,4 X e 2,5 X nas preparações uterinas quando comparado ao controle-solvente, etanol 10%. Conclui-se que o BFA aumentou a eficácia da ocitocina na preparação uterina.



## 6. Perspectivas

- Validação de métodos analíticos para determinação de BFA em matrizes diversas como, por exemplo, bebida alcoólica, água para consumo humano e leite humano;
- Acreditação de métodos analíticos desenvolvidos para análise de BFA em fórmulas infantis;
- Participação em ensaios de proficiência;
- Elaboração de projetos de pesquisa financiados por agências de fomento para a determinação de BFA em diversas matrizes;
- Estabelecimento de parcerias e programas de atuação conjunta com as vigilâncias estaduais e municipais, objetivando prevenção, controle e monitoramento;
- No ensaio toxicológico proposto, diminuir as doses de EE e realizar o ensaio com BFA, nas mesmas doses, porém empregando-se um solvente diferente do etanol 10%.
- Realização de ensaios toxicológicos envolvendo baixas doses de BFA que possam preencher lacunas ou inconsistências na literatura e contribuam com a comunidade científica e autoridades em segurança alimentar no processo decisório;
- Estabelecimento de programas e ações conjuntas junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária para uma avaliação de risco mais abrangente, envolvendo outras fontes de exposição, faixas etárias e segmentos populacionais;
- Fornecimento de subsídios e informações que auxiliem agências reguladoras e autoridades competentes nos processos decisórios e regulamentares.

## Referências

ACCIOLY, E.; SAUNDERS, C.; LACERDA, E.M.A. **Nutrição em Obstetrícia e Pediatria**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2002. 540p.

ACKERMAN, L.; NOONAN, G.; HEISERMAN, W.; ROACH, J.; LIMM, W.; BEGLEY, T. Determination of Bisfenol A in U.S. Infant Formulas: Updated Methods and Concentrations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 58, n. 4, p. 2307-13, 2010.

AKINGBEMI, B.T; SOTTAS, C.M.; KOULOVA, A.I; KLINEFELTER, G.R; HARDY, M.P. Inhibition of testicular steroidogenesis by the xenoestrogen bisphenol A is associated with reduced pituitary luteinizing hormone secretion and decreased steroidogenic enzyme gene expression in rat Leydig cells. **Endocrinology**. v.145, n.2, p.592-603, 2004.

ALDER, R.W.; BAKER, R.; BROWN, J.M. **Mechanisms in Organic Chemistry**. New York: Wiley, 1978. p. 280.

ALIN, J.; HAKKARAINEN, M.. Migration from polycarbonate packaging to food simulants during microwave heating. **Polymer Degradation and Stability**, v.97, p. 1387-95, 2012.

ALOISI, A.M.; DELLA SETA, D.; RENDO, C.; CECCARELLI, I.; SCARAMUZZINO, A.; FARABOLLINI, F. Exposure to the estrogenic pollutant bisphenol A affects pain behavior induced by subcutaneous formalin injection in male and female rats. **Brain Research**. v.937, n.1/2, p.1-7, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **Materiais de referência – Princípios gerais e estatísticos para certificação: ABNT ISO GUIA 35/2012**. Rio de Janeiro, 2012.

<sup>a</sup>ASSOCIATION OF PLASTICS MANUFACTURERS IN EUROPE. **Answer to the EFSA request for further information on uses of bisphenol A (BPA)**. D. Thomas, 23/01/2006.

<sup>b</sup>ASSOCIATION OF PLASTICS MANUFACTURERS IN EUROPE. **Answer to EFSA request on presence of BPA in PVC for food contact applications**. D. Thomas, 16/02/2006.

<sup>c</sup>ASSOCIATION OF PLASTICS MANUFACTURERS IN EUROPE. **Answer to EFSA request on presence of BPA in PVC for food contact applications**. D. Thomas, em 16/02/2006.

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, p.381-7, 2002.

BASHEER, C.; LEE, H.K.; TAN, K.S. Endocrine disrupting alkylphenols and bisphenol-A in coastal waters and supermarket seafood from Singapore. **Marine Pollution Bulletin**. v.48, p.1145-67, 2004.

BENIJTS, T.; LAMBERT, W.; DE LEENHEER, A. Analysis of multiple endocrine disruptors in environmental waters via wide-spectrum solid-phase extraction and dual-polarity ionization LC-ion trap-MS/MS. **Analytical Chemistry**. v.76, p.704-11, 2004.

BIEDERMANN, M.; GROB, K. Food contamination from epoxy resins and organosols used as can coatings: analysis by gradient NPLC. **Food Additives and Contaminants**. v.15, p.609-18,1998.

<sup>a</sup>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 and Food Chemistry**. v.45, p.4697-4700, 1997.

<sup>b</sup>BILES, J.E.; MCNEAL, T.P.; BEGLEY, T.H.; HOLLIFIELD, H.C. Determination of bisphenol A in reusable polycarbonate food-contact plastics and migration to food-simulating liquids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.45, p.3541-4, 1997.

BOAS PRÁTICAS EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. In: Manual da Qualidade. Rio de Janeiro:INCQS/FIOCRUZ. Seção 4.3. (POP 65.3340.002)

BORON, W.F.; BOULPAEP, E.L. **Medical Physiology: A Cellular and Molecular Approach**. Saunders: Elsevier Science (USA), First Edition, 1319 p., 2003.

BRASIL. Resolução RDC nº 41 de 17 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, 17 de setembro de 2011.

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.

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, p.189-98, 2005.

BRENN-STRUCKHOFOVA, Z.; CICHNA-MARKL, M. Determination of bisphenol A in wine by sol-gel immunoaffinity chromatography, HPLC and fluorescence detection. **Food Additives and Contaminants**, v.23, p.1227-35, 2006.

BROTONS, J.A.; OLEA-SERRANO, M.F.; VILLALOBOS, M.; PEDRAZA, V.; OLEA, N. Environmental Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. **Environmental Health Perspectives**, v.103, p.608–612, 1995.

BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG (BfR). **Neue Studien zu Bisphenol A stellen die bisherige Risikobewertung nicht in Frage**. 2008. Disponível em: <[http://www.bfr.bund.de/cm/216/neue\\_studien\\_zu\\_bisphenol\\_a\\_stellen\\_die\\_bisherige\\_risikobewertung\\_nicht\\_in\\_frage.pdf](http://www.bfr.bund.de/cm/216/neue_studien_zu_bisphenol_a_stellen_die_bisherige_risikobewertung_nicht_in_frage.pdf)>. Acesso em: 13/02/2010.

CAO, X.L.; DUFRESNE, G.; BELISLE, S; CLEMENT, G; FALICKI, M; BERARDIN, F; RULIBIKIYE, A. Levels of bisphenol A in canned liquid infant formula products in Canada and dietary intake estimates. **Journal of Agricultural and Food**

**Chemistry**, v.56, p.7919-24, 2008.

CARABIAS-MARTÍNEZ, R.; RODRIGUEZ-GONZALO, E.; REVILLA-RUIZ, P. Determination of endocrine-disrupting compounds in cereals by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. Study of background contamination. **Journal of Chromatography A**, v.1137, p.207-15, 2006.

CARABIAS-MARTÍNEZ, R.; RODRIGUEZ-GONZALO, E.; REVILLA-RUIZ, P.; HERNÁNDEZ-CECCARELLI, I.; DELLA SETA, D.; FIORENZANI, P.; FARABOLLINI, F.; ALOISI, A.M. Estrogenic chemicals at puberty change ER $\alpha$  in the hypothalamus of male and female rats. **Neurotoxicology and Teratology**. V. 29, n.1, p.108–15, 2007.

CHANG, C.M.; CHOU, C.C.; LEE, M.R. Determining leaching of bisphenol A from plastic containers by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v.539, p.41-7, 2005.

CHANG, H. S.; CHOO, K. H.; LEE, B.; CHOI, S. J. The methods of identification, analysis, and removal of endocrine disrupting compounds (EDCs) in water. **Journal of Hazardous Materials**, v.172, p.1-12, 2009.

CHAPIN, R.; ADAMS, J; BOEKELHEIDE, K.; GRAY, L.; HAYWARD, S.; LEES, P.; MCINTYRE, B.; PORTIER, K.; SCHNORR, T.; SELEVAN, S.; VANDENBERG, J.; WOSKIE, S. **NTP-CERHR Expert Panel Report on the Reproductive and Developmental Toxicity of Bisphenol A**. 2007. Disponível em: <<http://cerhr.niehs.nih.gov/chemicals/bisphenol/bisphenol.html>. Acesso em 20/09/13.

CONSUMERS UNION. **Concern over canned foods**. 2009. Disponível em: <<http://www.consumerreports.org/cro/magazine-archive/december-2009/food/BFA/overview/bisphenol-a-ov.htm>>. Acesso em: 18/02/2010.

COVACI, A.; VOORSPOELS, S. Optimization of the determination of polybrominated diphenyl ethers in human serum using solid-phase extraction and gas chromatography-electron capture negative ionization mass spectrometry. **Journal of**

**Chromatography B.** v.827, p.216-23, 2005.

D'ANTUONO, A.; CAMPO DALL'ORTO, V.; LO BALBO, A.; SOBRAL, S.; REZZANO, I. Determination of Bisphenol A in Food-Simulating Liquids Using LCED with a Chemically Modified Electrode. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49 p.1098 – 1098, 2001.

DELLA SETA, D.; MINDER, I; DESSI-FULGHERI, F; FARABOLLINI, F. Bisphenol-A exposure during pregnancy and lactation affects maternal behavior in rats. **Brain Research Bulletin.** v.65, n.3, p.255-60, 2005.

DESSI-FULGHERI, F.; PORRINI, S.; FARABOLLINI, F. Effects of perinatal exposure to bisphenol A on play behavior of female and male juvenile rats. **Environmental Health Perspectives.** v.110, suppl. 3, p.403-7, 2002.

DETERMINAÇÃO DO PESO CORPORAL DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO. In: Manual da Qualidade. Rio de Janeiro:INCQS/FIOCRUZ. Seção 4.3. (POP 65.3300.005)

DODO, G.H.; KNIGHT, M.M. Application of polydivinylbenzene liquid chromatography columns to remove lipid material from fish tissue extracts for the analysis of semivolatile organics. **Journal of Chromatography A.** v.859, p.235-40, 1999.

DODSON, R.E.; NISHIOKA, M.; STANDLEY, L.J.; PEROVICH, L.J.; BRODY, J.G.; RUDEL, R.A. Endocrine disruptors and asthma-associated chemicals in consumer products. **Environmental and Health Perspectives**, v.120, 935-43, 2012.

EHLERT, K.A.; BEUMER, C.W.E.; GROOT, M.C.E.. Migration of bisphenol A into water from polycarbonate baby bottles during microwave heating. **Food Additives and Contaminants: Part A**, v. 25, n.7, p.904-10, 2008.

ENSAIO BIOLÓGICO DA OCITOCINA- MÉTODO DA CONTRAÇÃO DO ÚTERO ISOLADO DE RATO FÊMEA. In: Manual da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ. Seção 10. (65.3310.003)

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **EPA to Scrutinize Environmental Impact of Bisphenol A.** 2010. Disponível em: <<http://yosemite.epa.gov/opa/admpress.nsf/d0cf6618525a9efb85257359003fb69d/78110048d7f696d1852576f50054241a!OpenDocument>>. Acesso em: 26/08/2010.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane(Bisphenol A). **EFSA Journal.** v. 428, p.1-75, 2006.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). **DRAFT Scientific Opinion on the Risks to Public Health Related to the Presence of Bisphenol A (BPA) in Foodstuffs—Part: Exposure Assessment;** EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids (CEF). Parma: European Food Safety Authority (EFSA), 2013.

EUROPEAN INFORMATION CENTRE ON BISPHENOL A. **What is Bisphenol A?** Disponível em : <[http://www.bisphenol-a-europe.org/en\\_GB/what-is-bisphenol-a](http://www.bisphenol-a-europe.org/en_GB/what-is-bisphenol-a)>. Acesso em: 10/09/2013.

FACCIOLO, R.M.; ALO, R.; MADEO, M.; CANONACO, M.; DESSI-FULGHERI, F. Early cerebral activities of the environmental estrogen bisphenol A appear to act via the somatostatin receptor subtype sst2. **Environmental Health Perspectives.** v.110, suppl. 3, p.397-402, 2002.

FAN, Y.; DING, S.; YE, X.; MANYANDE, A.; HE, D.; ZHAO, N.; YANG, H.; JIN, X.; LIU, J.; TIAN, C.; XU, S.; YING, C. Does preconception paternal exposure to a physiologically relevant level of bisphenol A alter spatial memory in an adult rat?. **Hormones and Behavior**, v.64, p. 598-604, 2013.

FARABOLLINI, F.; PORRINI, S.; DELLA SETA, D.; BIANCHI, F.; DESSI-FULGHERI, F. Effects of perinatal exposure to bisphenol A on sociosexual behavior of female and male rats. **Environmental Health Perspectives.** v.110, suppl. 3, p.409-14, 2002.

FERNANDEZ, S. V.; RUSSO, J. Estrogen and Xenoestrogens in Breast Cancer.

**Toxicologic Pathology**. v. 38, n.1, p.110-22, 2009.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Draft Assessment of Bisphenol A for Use in Contact with Food Applications**. 2008. Disponível em: <[http://www.fda.gov/ohrms/dockets/AC/08/briefing/20080038b1\\_01\\_02\\_FDA%20BFA%20Draft%20Assessment.pdf](http://www.fda.gov/ohrms/dockets/AC/08/briefing/20080038b1_01_02_FDA%20BFA%20Draft%20Assessment.pdf)>. Acesso em: 15/02/2010.

FOOD STANDARD AUSTRALIA NEW ZELAND (FSANZ). **Bisphenol A (BFA) and food packaging**. 2009. Disponível em: <<http://www.foodstandards.gov.au/scienceandeducation/factsheets/factsheets2009/bisphenolaBFAandfood4218.cfm>>. Acesso em: 15/04/10.

GALLART-AYALA, H.; MOYANO, E.; GALCERAN, M.T. Liquid chromatography/multi-stage mass spectrometry of bisphenol A and its halogenated derivatives. **Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM**. v.21, p.4039-48, 2007.

GEENS, T.; GOEYENS, L.; KANNAN, K.; NEELS, H.; COVACI, A. Levels of bisphenol-A in thermal paper receipts from Belgium and estimation of human exposure. **Science of the Total Environment**, v.435-36, p.31-3, 2012.

GERLACH, M. **Danmark forbyder giftigt stof i sutteflasker**. 2010. Disponível em: <<http://www.dr.dk/Nyheder/Politik/2010/03/26/113304.htm>>. Acesso em: 26/08/10.

GOETZ, V.N.; WORMUTH, M.; SCHERINGER, M.; HUNGERBUHLER, K.. Bisphenol A: How the Most Relevant Exposure Sources Contribute to Total Consumer Exposure. **Risk Analysis**, v. 30, p.473-87, 2010.

GOODSON, A.; SUMMERFIELD, W.; COOPER, I. Survey of bisphenol A and bisphenol F in canned foods. **Food Additives and Contaminants**, v.19, p.796-802, 2002.

GOVERNMENT OF CANADA. **Government of Canada Protects Families With Bisphenol A Regulations**. 2008. Disponível em: <<http://www.chemicalsubstanceschimiques.gc.ca/challenge-defi/batch-lot-2/bisphenol->



a/index-eng.php>. Acesso em: 13/02/2010.

GraphPad Software Inc. GraphPad Prism versão 6.00 for Mac OS X. La Jolla: GraphPad Software Inc, 2015. Disponível em: < [http:// www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)>. Acesso em 30/04/2015.

GUPTA, C. Reproductive malformation of the male offspring following maternal exposure to estrogenic chemicals. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. v.224, n.2, p.61-8, 2000.

GYONG, Y.; SHIN, J.H.;KIM, H.Y.; KHIM, J.; LEE, M.K.; HONG, J. Application of solid-phase extraction coupled with freezing-lipid filtration clean-up for the determination of endocrine-disrupting phenols in fish. ***Analytica Chimica Acta***, v. 603, p.67-75, 2007.

HOWDESHELL, K.I.; HOTCHKISS, A.K.; THAYER, K.A.; VANDENBERGH, J.G.; VOM SAAL, F.S. Exposure to bisphenol A advances puberty. ***Nature***.v.401, n.6755, p.763-4, 1999.

HUNT, P.A.; KOEHLER, K.E.; SUSIARJO, M.; HODGES, C.A.; HAGAN, A.; VOIGT, R.C.; THOMAS, S.; THOMAS, B.F.; HASSOLD, T.S. Bisphenol A causes meiotic aneuploidy in the female mouse. ***Current Biology***. v.13, n.7, p.546-53, 2003.

HWANG, K.A.; PARK, M.A.; KANG, N.H.; YI, B.R.; HYUN, S.H.; JEUNG, E.B.; CHOI, K.C. Anticancer effect of genistein on BG-1 ovarian cancer growth induced by 17 $\beta$ -estradiol or bisphenol A via the supression of the crosstalk between estrogen receptor alpha and insulin-like growth factor-1 receptor signalling pathways. ***Toxicology and Applied Pharmacology***, v.272, p. 637-46, 2013.

IAVIOLA, G.; GIOIOSA, L.; ADRIANIA, W.; PALANZA, P. d-Amphetamine-related reinforcing effects are reduced in mice exposed prenatally to estrogenic endocrine disruptors. ***Brain Research Bulletin***. v.65, p.235-40, 2005.

INTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Estudo nacional de despesa familiar. Rio de Janeiro: IBGE, 1977, 80p.

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

INOUE, K.; MURAYAMA, S.; TAKEBA, K.; YOSHIMURA, Y.; NAKAZAWA, H. Contamination of xenoestrogens bisphenol A and F in honey: safety assessment and analytical method of these compounds in honey. **Journal of Food Composition and Analysis**. v.16, p.497-06, 2003.

ISO, T; WATANABE, T; IWAMOTO, T; SHIMAMOTO, A.; FURUICHI, Y. DNA damage caused by Bisphenol A and estradiol through estrogenic activity. **Biology and Pharmacology Bulletin**. v.29, p. 206–10, 2006.

JIN, X.; JIANG, G.; HUANG, G.; LIU, J.; ZHOU, Q. Determination of 4-tert-octylphenol, 4-nonylphenol and bisphenol A in surface waters from the Haihe River in Tianjin by gas chromatography-mass spectrometry with selected ion monitoring. **Chemosphere**.v.56, p.1113-9, 2004.

JOSKOW, R.; BARR, D.B.; BARR, J.R.; CALAFAT, A.M.; NEEDHAM, L.L.; RUBIN, C. Exposure to bisphenol A from bis-glycidyl dimethacrylate-based dental sealants. **Journal of American Dentists Association**, v.137, p.353-62, 2007.

KANG, J.H.; KONDO, F. Determination of bisphenol A in canned pet foods. **Research in Veterinary Science**, v.73, p.177-82, 2002.

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, p.1439-43, 2003.

KANG, J.H.; KONDO, F.; KATAYAMA, Y. Importance of control of enzymatic degradation for determination of bisphenol A from fruits and vegetables. **Analytica Chimica Acta**. v.555, p.114-7, 2006.

KANG., N.H.; HWANG, K.A.; LEE, H.R.; CHOI, D.W.; CHOI, K.C. Resveratrol regulates the cell viability promoted by 17 $\beta$ -estradiol or bisphenol A via down-regulation of the cross-talk between estrogen receptor  $\alpha$  and insulin growth factor 1 receptor in BG-1 ovarian cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 59, p. 373-9, 2013.

KANNO, J.; ONYON, L.; PEDDADA, S.; ASHBY, J.; JACOB, E.; OWENS, W. The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay Phase 2: Coded Single-Dose Studies. **Environmental Health Perspectives**. v. 111, n. 12, p. 1550-8, 2003.

KAWAI, K.; MURAKAMI, S.; SENBA, E.; YAMANAKA, T.; FUJIWARA, Y.; ARIMURA, C.; NOZAKI, T.; TAKII, M.; KUBO, C. Changes in estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  expression in the brain of mice exposed prenatally to bisphenol A. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. v.47, n. 2, p.166–70, 2007.

KAWAI, K.; TAKEHIRO, N.; NISHIKATA, H., AOU, S.; TAKII, M.; KUBO, C. Aggressive behavior and serum testosterone concentration during the maturation process of male mice: the effects of fetal exposure to bisphenol A. **Environmental Health Perspectives**. v.111, p.175-8, 2003.

KERI, R.A.; HO, S.M.; HUNT, P.A.; KNUDSEN, K.E.; SOTO, A.M.; PRINS, G.S. An evaluation of evidence for the carcinogenic activity of bisphenol A. **Reproductive Toxicology**. v.24, p. 240-52, 2007.

KERSTING, M.; ALEXU, U.; SICHERT-HELLERT, W.; MANZ, F.; SCHOCH, G. Measured consumption of commercial infant food products in German infants: results from the DONALD study. Dortmund Nutritional and Anthropometrical Longitudinally Designed. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**. v.27, p.547-552, 1998.

KISSINGER, M.; RUST, S. **BFA industry fights back**. 2009. Disponível em:<<http://www.jsonline.com/watchdog/watchdogreports/54195297.html>>. Acesso em: 17/02/2010.

KLINGE, C.M. Estrogen receptor interaction with co-activators and corepressors. **Steroids**. v.65, n.5, p.227–51, 2000.

KUBO, K.; ARAI, O.; OGATA, R.; OMURA, M.; HORI, T.; AOU, S. Exposure to bisphenol A during the fetal and suckling periods disrupts sexual differentiation of the locus coeruleus and of behaviour in the rat. **Neuroscience Letters**. v.304, n.1/2, p.73–6, 2003.

KUBO, K.; ARIA, O.; OMURA, M.; WATANABE, R.; OGATA, R.; AOU, S. Low dose effects of bisphenol A on sexual differentiation of the brain and behavior in rats. **Neuroscience Research**. v.45, n.3, p.345-56, 2003.

KUBWABO, C.; KOSARAC, I.; STEWART, B.; GAUTHIER, B.R.; LALONDE, K.; LALONDE, P.J.. Migration of bisphenol A from plastic baby bottles, baby bottle liners and reusable polycarbonate drinking bottles. **Food Additives and Contaminants: Part A**, v.26, n.6, p.928-37, 2009.

KUO, H.W.; DING, W.H. Trace determination of bisphenol A and phytoestrogens in infant formula powders by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1027, p.67-74, 2004.

LANG, I.A.; GALLOWAY, T.S.; SCARLETT, A.; HENLEY, W.E. DEPLEDGE M.; WALLACE, R.B.; MELZER, D. Association of Urinary Bisphenol A Concentration With Medical Disorders and Laboratory Abnormalities in Adults. **Journal of**

**American Medical Association (JAMA)**, v.300, p.1303–10, 2008.  
DOI:10.1001/jama.300.11.1303

LAYTON, L. **No BFA For Baby Bottles In U.S.** 2008. Disponível em:<  
[http://www.washingtonpost.com/wp-](http://www.washingtonpost.com/wp-dyn/content/article/2009/03/05/AR2009030503285.html)  
[dyn/content/article/2009/03/05/AR2009030503285.html](http://www.washingtonpost.com/wp-dyn/content/article/2009/03/05/AR2009030503285.html)>. Acesso em: 16/02/2010.

LAYTON, L. **Strategy Being Devised To Protect Use of BFA.** 2009. Disponível em:<  
[http://www.washingtonpost.com/wp-](http://www.washingtonpost.com/wp-dyn/content/article/2009/05/30/AR2009053002121.html)  
[dyn/content/article/2009/05/30/AR2009053002121.html](http://www.washingtonpost.com/wp-dyn/content/article/2009/05/30/AR2009053002121.html)>. Acesso em: 17/02/2010.

LEE, H.J. CHATTOPADHYAY, S; GONG, E.Y.; AHN, R.S.; LEE, K. Antiandrogenic effects of bisphenol A and nonylphenol on the function of androgen receptor. **Toxicological Sciences**.v.75, n.1, p. 40–6, 2003.

LEE, S.; LIU, X.; TAKEDA, S.; CHOI, K. Genotoxic potentials and related mechanisms of bisphenol A and other bisphenol compounds: A comparison study employing chicken DT40 cells. **Chemosphere**, v. 93, p. 434-40, 2013.

LEMONDE. **Les sénateurs votent la suspension de la commercialisation dès biberons au Bisphenol A.** 2010. Disponível em:<  
[http://www.lemonde.fr/planete/article/2010/03/24/les-senateurs-votent-la-suspension-de-la-commercialisation-des-biberons-au-bisphenol-a\\_1324041\\_3244.html](http://www.lemonde.fr/planete/article/2010/03/24/les-senateurs-votent-la-suspension-de-la-commercialisation-des-biberons-au-bisphenol-a_1324041_3244.html)>. Acesso em: 26/08/2010.

LIAO, C.; KANNAN, K. Widespread occurrence of bisphenol A in paper and paper products: Implications for human exposure. **Environmental Science and Technology**, v.45, p.9372–79, 2011.

LIMPEZA, DESINFECÇÃO E ESTERILIZAÇÃO EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. In: Manual da Qualidade. Rio de Janeiro:INCQS/FIOCRUZ. Seção 4.3. (POP 65.3340.001)

LINTSCHINGER, J.; RAUTER, W. Bisphenols in Food - separation of Bisphenol A diglycidyl ether, Bisphenol F diglycidyl ether - using a LiChrospher RP-8 column -

fluorescence detection. **European Food Research and Technology**. v.21, p.211-7, 2000.

LOPEZ-CERVANTES, J.; PASEIRO-LOSADA, P. Determination of bisphenol A in, and its migration from, PVC stretch film used for food packaging. **Food Additives and Contaminants**, v. 20, p. 596- 606, 2003.

LÓPEZ-CERVANTES, J.; PASEIRO-LOSADA, P. Determination of bisphenol A in, and its migration from, PVC stretch film used for food packaging. **Food Additives and Contaminants**, v.20, p.596-606, 2003.

LOPEZ-CERVANTES, J.; SANCHEZ-MACHADO, D. I.; PASTORELLI, S.; RIJK, R.; PASEIRO-LOSADA, P. Evaluating the migration of ingredients from active packaging and development of dedicated methods: a study of two iron-based oxygen absorbers. **Food Additives and Contaminants**, v.20, p. 291-9, 2003.

LÜLMANN, H.; MOHR, K.; HEIN, L.; BIEGER, D. **Farmacologia – Texto e Atlas**. Porto Alegre: Artmed, 5<sup>o</sup>ed., 416p., 2008.

MAHMOUD, M. Studies of hydrogen/deuterium exchange of monodeuteriophenol in fused-silica capillary columns using gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v.719 p. 474-8, 1996.

MAIA, J.; CRUZ, J.M.; SENDÓN, R.; BUSTOS, J.; SANCHEZ, J.J; PASEIRO, P. Effect of detergents in the release of bisfenol A from polycarbonate baby bottles. **Food Research International**. v.42, p. 1410-14, 2009.

MARAGOU, N.K; MAKRI, A.; LAMPI, E.N.; THOMAIDIS, N.S.; KOUPPARIS, M.A. Migration of bisphenol A from polycarbonate baby bottles under real use conditions. **Food Additives and Contaminants**, v. 25, n.3, p.373-83, 2008.

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

73, 2006.

MARCAÇÃO PADRÃO DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO. In: Manual da Qualidade. Rio de Janeiro:INCQS/FIOCRUZ. Seção 4.3. (POP 65.3300.002).

MENDIOLA, J.A.; HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Use of compressed fluids for sample preparation: food and environmental applications. **Journal of Chromatography A**. v.1152, p.234-46, 2007.

MOTOYAMA, A.; SUZUKI, A.; SHIROTA, O.; NAMBA, R. Direct determination of bisphenol A and nonylphenol in river water by column-switching semi-microcolumn liquid chromatography/electrospray mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM**. v.13, p.2204-8, 1999.

MATTHIESSEN, P.; JOHNSON, I. Implications of research on endocrine disruption for the environmental risk assessment, regulation and monitoring of chemicals in the European Union. **Environmental Pollution**, v.146, p. 9-18, 2007.

MENDEZ, J. Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples. **Journal of Chromatography A**, v.1089 p.1-17, 2005.

METODO DE EUTANÁSIA PARA ANIMAIS DE LABORATÓRIO. In: Manual da Qualidade. Rio de Janeiro:INCQS/FIOCRUZ. Seção 4.3. (POP 65.3340.008)

MÉTODO DE EUTANÁSIA PARA ANIMAIS DE LABORATÓRIO. In: Manual da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ. Seção 4.3. (65.3340.008).

MIDIO, A.F.; IZUMIDA, D. **Toxicologia de Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, p.232-252, 2000.

MIYAMOTO, K.; KOTAKE, M. Estimation of daily bisphenol a intake of Japanese individuals with emphasis on uncertainty and variability. **Environmental Science**, v.13: 15-29, 2006.

MORIYAMA, K.; TAGAMI, T.; AKAMIZU, T.; USUI, T.; SAIJO, M.; KANAMOTO, N.; HATAYA, Y.; SHIMATSU, A.; KUZUYA, H.; AND NAKAO, K. Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. v.87, p. 5185-90, 2002.

MUNGUÍA-LÓPEZ, E.M.; GERARDO-LUGO, S.; PERALTA, E.; BOLUMEN, S.; SOTO-VALDEZ, H. Migration of bisphenol A (BPA) from can coatings into a fatty-food simulant and tuna fish. **Food and Additives and Contaminants**, v.22, p.892-8, 2005.

MUNGUÍA-LÓPEZ, E.M.; PERALTA, E.; GONZÁLEZ-LEÓN, A.; VARGAS-REQUENA, C.; SOTO-VALDEZ, H. Migration of bisphenol A (BPA) from epoxy can coatings to jalapeño peppers and an acid food simulant. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.7299-302, 2002.

MUNGUÍA-LÓPEZ, E.M.; SOTO-VALDEZ, H. Effect of heat processing and storage time on migration of bisphenol A (BPA) and bisphenol A-diglycidyl ether (BADGE) to aqueous food simulant from Mexican can coatings. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.3666-71, 2001.

NAGEL, S.C.; VOM SAAL, F.S.; THAYER, K.A.; DHAR, M.G.; BOECHLER, M.; WELSHONS, W.V. Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol. **Environmental Health Perspectives**. v.105, n.1, p.70-6, 1997.

NATIONAL INSTITUTE OF ENVIRONMENTAL HEALTH SCIENCES (NIEHS). **Since You Asked - Bisphenol A (BFA) /Questions and Answers about Bisphenol A**. 2008. Disponível em: <<http://www.niehs.nih.gov/news/media/questions/sya-BFA.cfm>>. Acesso em: 15/02/2010.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM (NTP). **NTP-CERHR Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of Bisphenol A**. 2008. Disponível em: < <http://cerhr.niehs.nih.gov/evals/bisphenol/bisphenol.pdf>>. Acesso em: 10/01/2010.



NEGISHI, T.; KAWASAKI, K.; SUZAKI, S.; MAEDA, H.; ISHII, Y.; KYUWA, S.; KURODA, Y.; YOSHIKAWA, Y. Behavioral alterations in response to fear-provoking stimuli and tranylcypromine induced by perinatal exposure to bisphenol A and nonylphenol in male rats. **Environmental Health Perspectives**. v.112, n.11, p.1159-64, 2004.

NERÍN, C.; PHILO, M.R.; SALAFRANCA, J.; CASTLE, L. Determination of bisphenol-type contaminants from food packaging materials in aqueous foods by solid-phase microextraction-high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 963, p.375-80, 2002.

ORAZIO, C.; MEADOWS, J.; KAPILA, S.; PALMER, C.; YANDERS, A.F. Simple clean-up procedures for determination of polychlorinated dibenzo-p-dioxin and polychlorinated dibenzofurans in waste oil, soil and biological tissue samples. **Chemosphere**. v.18 p.69-76, 1989.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **BISPHENOL A - 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: 16/02/2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). WHO Child Growth Standards. 2006. Disponível em: <http://who.int/childgrowth/en/>. Acesso em 14/10/13.

<sup>a</sup>ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Test No. 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation In Vitro Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists**. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, 2012.

<sup>b</sup>ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Test No. 457: BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists**. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, 2012.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Test No. 440: Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties.** OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, 2007. doi: 10.1787/9789264067417-en

OTAKA, H.; YASUHARA, A.; MORITA, M.. Determination of bisphenol A and 4-nonylphenol in human milk using alkaline digestion and cleanup by solid-phase extraction. **Analytical Science**, v.19, p.1663–6, 2003.

OZAKI, A.; BABA, T. Alkylphenol and bisphenol A levels in rubber products. **Food Additives and Contaminants**, v.20, p.92-8, 2003.

PALANZA, P.; HOWDESHELL, K.L.; PARMIGIANI, S.; VOM SAAL, F.S. Exposure to a low dose of bisphenol A during fetal life or in adulthood alters maternal behavior in mice. **Environmental Health Perspectives**. v.110, suppl. 3, p.415-22, 2002.

PEDERSEN, S.N.; LINDHOLST, C. Quantification of the xenoestrogens 4-tert-octylphenol and bisphenol A in water and in fish tissue based on microwave assisted extraction, solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v.864, p.17-24, 1999.

REQUISIÇÃO, RECEBIMENTO E DISTRIBUIÇÃO DE ANIMAIS E SANGUE. In: Manual da Qualidade. Rio de Janeiro:INCQS/FIOCRUZ. Seção 4.3. (POP 65.3340.003)

RICHTER, C.; TAYLOR, J.; RUHLEN, R.; WELSHONS, W.; VOM SAAL, F. Estradiol and Bisfenol a stimulate androgen receptor and estrogen receptor gene expression in fetal mouse prostate mesenchyme cells. **Environmental health perspectives**, v.115, n.6, p.902–8, 2007.

ROZENFELD, S.(ORG). **Fundamentos da Vigilância Sanitária**. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2000.

RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; LÓPEZ DE ALDA, M.J.; BARCELÓ, D.. Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment

plants by solid-phase extraction–liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1045, p.85–92, 2004.

RUBIN, B.S.; MURRAY, M.K.; BAMASSA, D.A.; KING, J.C.; SOTO, A.M. Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels. **Environmental Health Perspectives**. v.109, n.7, p.675–80, 2001.

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

RUDEL, R.A.; CAMANN, D.E.; SPENGLER, J.D.; KORN, L.R.; BRODY, J.G. Phthalates, alkylphenols, pesticides, polybrominated diphenyl ethers, and other endocrine-disrupting compounds in indoor air and dust. **Environmental and Science Technology**, v.37, p.4543-53, 2003.

RUNYON, J., NOTI, A., GROB, K., BIEDERMANN, M., AND DUDLER, V. Isolation of the < 1000 Dalton Migrants from Food Packaging Materials by Size Exclusion Chromatography (SEC). **Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene**, v.93, p. 57-72, 2002.

RUST, S; KISSINGER, M. **'Watchdog' advocates for BFA**. 2009. Disponível em: <<http://www.jsonline.com/watchdog/watchdogreports/54195302.html>>. Acesso em: 17/02/2010.

RYAN, B.C.; VANDENBERGH, J.G. Developmental exposure to environmental estrogens alters anxiety and spatial memory in female mice. **Hormones and Behavior**. v.50, n.1, p.85-93, 2006.

SALAFRANCA, J.;BATTLE, R.; NERÍN, C. Use of solid-phase microextraction for the analysis of bisphenol A and bisphenol A diglycidyl ether in food simulants.**Journal of Chromatography A**, v.864, p.137-44, 1999.

SAREWITZ, D. "World view: A tale of two sciences". **Nature**, v. 462, n. 7273, p. 566. 2009.

SCHONFELDER, G.; FLICK, B.; MAYR, L.; TALSNESS, C.; PAUL, M.; CHAHOUD, I. *In utero* exposure to lowdoses of bisphenolAlead to long-term deleterious effects in the vagina. **Neoplasia**. v.4, p.98-102, 2002.

SCHONFELDER, G.; FRIEDRICH, K.; PAUL, M.; CHAHOUD, I. Developmental effects of prenatal exposure to bisphenol A on the uterus of rat offspring. **Neoplasia**. v.6, p.584-94, 2004.

SHAO, B.; HAN, H.; HU, J.; ZHAO, J.; WU, G.; XUE, Y.; MA, Y.; ZHANG, S. 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.

<sup>a</sup>SHAO, B.; HAN, H.; LI, D.; MA, Y.; TU, X.; Wu, Y. Analysis of alkylphenol and bisphenol A in meat by accelerated solvent extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**. v.105, p.1236-41, 2007.

<sup>b</sup>SHAO, B.; HAN, H.; TUN, X.; HUANG, L. 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, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**. v.850, p. 412-6, 2007.

SOUZA, S.V.C. Procedimentos para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos. **Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos pela Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais**, 2007.

STUART, J.D.; CAPULONG, C.P.; LAUNER, K.D.; PAN, X. Analyses of Phenolic Endocrine Disrupting Chemicals in Marine Samples by Both Gas and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, **Journal of Chromatography A**. v.1079, p.136-145, 2005.

SUN, Y.; IRIE, M.; KISHIKAWA, N.; WADA, M.; KURODA, N.; NAKASHIMA, K.. Determination of bisphenol A in human breast milk by HPLC with column-switching and fluorescence detection. **Biomedical Chromatography**, v.18, p.501–7, 2004.

SUN, C.; LEONG, L.P.; BARLOW, P.J.; CHAN, S.H.; BLOODWORTH, B.C. Single laboratory validation of a method for the determination of Bisphenol A, Bisphenol A diglycidyl ether and its derivatives in canned foods by reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1129, p.145-8, 2006.

SWISS FEDERAL OFFICE FOR PUBLIC HEALTH (SFOPH). **Faktenblatt Bisphenol A**. 2009. Disponível

em:<<http://www.bag.admin.ch/themen/lebensmittel/04861/06170/index.html?lang=de>>.

Acesso em: 15/02/2010.

TAKAHASHI, S.; CHI, X.J.; YAMAGUCHI, Y; SUZUKI, H; SUGAYA, S.; KITA, K.; HIROSHIMA, K.; YAMAMORI, H.; ICHINOSE, M.; SUZUKI, N. Mutagenicity of bisphenol A and its suppression by interferon- $\alpha$  in human RSa cells. **Mutation Research**. v.490, p.199–207, 2001.

TALSNESS, C.; FIALKOWSKI, O.; GERICKE, C.; MERKER, H.J.; CHAHOUD, I. The effects of low and high doses of bisphenol A on the reproductive system of female and male rat offspring. **Congenital Anomalies**. v.40, p.S94–107, 2000.

TAN, B. L.; MUSTAFA, A. M. Leaching of bisphenol A from new and old babies' bottles, and new babies' feeding teats. **Asia Pacific Journal of Public Health**, v.15, p.118-23, 2003.

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.

THOMSON, B.M.; GROUNDS, P.R. Bisphenol A in canned foods in New Zealand: an exposure assessment. **Food Additives and Contaminants**, v.22, p.65-72, 2005.

TIMMS, B.; HOWDESHELL, K.; BARTON, L.; BRADLEY, S.; RICHTER, C.; VOM SAAL, F.S. Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.102, n.19, p.7014-19, 2005.

TOYO'OKA, T.; OSHIGE, Y. Determination of alkylphenols in mineral water contained in PET bottles by liquid chromatography with coulometric detection. **Analytical Sciences**, v.16, p.1071-6, 2000.

TSUTSUI, T.; TAMURA, Y.; SUZUKI, A.; HIROSE, Y.; KOBAYASHI, M.; NISHIMURA, H.; METZLER, M.; BARRET, J.C. Mammalian cell transformation and aneuploidy induced by five bisphenols. **International Journal of Cancer**. v.86, p.151-4, 2000.

U.K FOOD SAFETY AGENCY (UKFSA). **The science underpinning the Agency's policy on BPA**. 2010. Disponível em: <<http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/BFAslidesjuly2010.pdf>>. Acesso em: 26/08/2010.

UNIÃO EUROPÉIA (UE). Commission Directive 2011/8/EU. 28 jan 2011. Amending Directive 2002/72/EC as regards the restriction of use of Bisphenol A in plastic infant feeding bottles. **Official Journal of the European Union**, L.26, 2011.

<sup>b</sup>UNIÃO EUROPÉIA (UE). Commission Regulation nº 10/2011. 14 jan 2011. On plastic materials and articles intended to come into contact with food. **Official Journal of the European Union**, L.12, 2011.

UNIÃO EUROPÉIA (UE). Performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of European Union**. L. 221-8, 2002.

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

VARELIS, P.; BALAFAS, D. Preparation of 4,4'-(1-[(2)H6]methylethylidene)bis-[2,3,5,6-(2)H4]phenol and its application to the measurement of bisphenol A in beverages by stable isotope dilution mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.883, p.163-70, 2000.

VOLBERG, V.; HARLEY, K.; CALAFAT, A.M.; DAVÉ, V.; MCFADDEN, J.; ESKENAZI, B.; HOLLAND, N. Maternal Bisphenol A Exposure During Pregnancy and Its Association With Adipokines in Mexican-American Children. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 54, p. 621-8, 2013.

VOM SAAL, F.S.; COOKE, P.S.; BUCHANAN, D.L.; PALANZA, P.; THAYER, K.A.; NAGEL, S.C.; PARMIGIANI, S.; WELSHONS, W.V. 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.239-60, 1998.

WANG, Y.; THUILLIER, R.; CULTY, M. Prenatal estrogen exposure differentially affects estrogen receptor-associated proteins in rat testis gonocytes. **Biology of Reproduction**. v71, n.5, p.1652-64, 2004.

WATABE, Y.; KONDO, T.; IMAI, H.; MORITA, M.; TANAKA, N.; HOSOYAULTA, K. Low Level Determination of Bisphenol A and Poly Aromatic Hydrocarbons in River Water Using Column-Switching HPLC with Fluorescence Detection. **Analytical Chemistry**, v.76, p.105-109, 2004.

WATABE, Y.; KONDO, T.; MORITA, M.; TANAKA, N.; HAGINAKA, J.; HOSOYA, K. 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, p. 45–9, 2004.

WATANABE, T.; YAMAMOTO, H.; INOUE, K.; YAMAGUCHI, A.; YOSHIMURA, Y.; KATO, K.; NAKAZAWA, H.; KURODA, N.; NAKASHIMA, K. Development of sensitive high-performance liquid chromatography with fluorescence detection using

4-(4,5-diphenyl-1*H*-imidazol-2-yl)- benzoyl chloride as a labeling reagent for determination of bisphenol A in plasma samples. **Journal of Chromatography B**. v.762, p.1-7, 2001.

WETHERILL, Y.B.; AKINGBEMI, B.T.; KANNO,J.; MCLACHLAN, J.A.; NADAL, A.; SONNENSCHEIN, C.; WATSON, C.S.; ZOELLER, R.T.; BELCHER, S.M. In vitro molecular mechanisms of bisphenol a action. **Reproductive Toxicology**. v.24, p. 178-98, 2007.

WILSON, N.K.; CHUANG, J.C.; LYU, C.; MENTON, R.; MORGAN, M.K.. Aggregate exposures of nine preschool children to persistent organic pollutants at day care and at home. **Journal Exposure Analysis and Environmental Epidemiology**, v.13, p.187-202, 2003.

WILSON, N.K.; CHUANG, J.C.; MORGAN, M.K.; LORDO, R.A.; SHELDON, L.S. An observational study of the potential exposures of preschool children to pentachlorophenol, bisphenol-A, and nonylphenol at home and daycare. **Environmental Research**, v.103, p.9-20, 2007.

WINGENDER, R.J.; NIKETAS, P.; SWITALA, C.K. Development of methods for the determination of bisphenol A in food simulants. **The Journal of Coatings Technology**. v.70, p.75-79, 1998.

WISTUBA, J.; BRINKWORTH, M.H.; SCHLATT, S.; CHAHOUD, I.; NIESCHLAG, E. Intrauterine bisphenol A exposure leads to stimulatory effects on Sertoli cell number in rats. **Environmental Research**. v.91, n.2, p.95-103, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Joint FAO/WHO Expert Meeting to Review Toxicological and Health Aspects of Bisphenol A: Summary Report including Report of Stakeholder Meeting on Bisphenol A**. Ottawa: World Health Organization, 2010.

YE, X.; KUKLENYIK, Z.; NEEDHAM, L.L.; CALAFAT, A.M. Measuring environmental phenols and chlorinated organic chemicals in breast milk using automated on-line



column-switching-high performance liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v.831, p.110-5, 2006.

YOSHIDA, T.; HORIE, M.; HOSHINO, Y.; NAKAZAWA, H. Determination of bisphenol A in canned vegetables and fruit by high performance liquid chromatography. **Food and Additives and Contaminants**, v.18, p.69-75. 2001.

YOSHINO, S.; YAMAKI, K.; LI, X.; SAI, T.; YANAGISAWA, R.; TAKANO, H.; TANEDA, S.; HAYASHI, H.; MORI, Y. Prenatal exposure to bisphenol A up-regulates immune responses, including T helper 1 and T helper 2 responses, in mice. **Immunology**. v.112, n.3, p.489-95, 2004.

ZHU, H.; XIAO, X.; ZHENG, J.; ZHENG, S.; DONG, K.; YU, Y. Growth-promoting effect of bisphenol a on neuroblastoma in vitro and in vivo. **Journal of Pediatric Surgery**. v.44, n.4, p. 672–80, 2009.

ZHU,H; ZHENG, J; XIAO, X; ZHENG, S; DONG, K; LIU, J; WANG, Y. Environmental endocrine disruptors promote invasion and metastasis of SK-N-SH human neuroblastoma cells. **Oncology reports**. v.23, n.1, p.129–39, 2010.

ZOELLER, R.T.; BANSAL, R.; PARRIS, C. Bisphenol-A, an environmental contaminant that acts as a thyroid hormone receptor antagonist *in vitro*, increases serum thyroxine, and alters RC3/neurogranin expression in the developing rat brain. **Endocrinology**. v.146, n.2, p.607-12, 2005.