



**UFRPE**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**GABRIEL ACIOLY DE LIMA**

**Determinação de disruptores endócrinos (bisfenol A e ftalatos) em utensílios  
e brinquedos para lactentes usando HPLC-UV-VIS e estudo de  
bioacessibilidade**

**Recife  
2019**

**GABRIEL ACIOLY DE LIMA**

**Determinação de disruptores endócrinos (bisfenol A e ftalatos) em utensílios  
e brinquedos para lactentes usando HPLC-UV-VIS e estudo de  
bioacessibilidade**

Dissertação de mestrado apresentado ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal Rural de Pernambuco como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. André F. Lavorante  
Coorientadora: Profa. Dra. Ana Paula S. Paim

**Recife  
2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Sistema Integrado de Bibliotecas  
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- L732d Lima, Gabriel Acioly de  
Determinação de disruptores endócrinos (bisfenol A e ftalatos) em utensílios e brinquedos para lactentes usando HPLC UV-VIS e estudo de bioacessibilidade / Gabriel Acioly de Lima. - 2019.  
98 f. : il.
- Orientador: Andre Fernando Lavorante .  
Coorientador: Ana Paula Silveira Paim .  
Inclui referências e anexo(s).
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Química, Recife, 2020.
1. Disruptores endócrinos. 2. Brinquedos. 3. Planejamento fatorial. 4. Bioacessibilidade. I. Lavorante , Andre Fernando, orient. II. Paim , Ana Paula Silveira, coorient. III. Título

**GABRIEL ACIOLY DE LIMA**

**Determinação de disruptores endócrinos (bisfenol A e ftalatos) em utensílios  
e brinquedos para lactentes usando HPLC-UV-VIS e estudo de  
bioacessibilidade**

Dissertação de mestrado apresentado ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal Rural de Pernambuco como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. André F. Lavorante

DISSERTAÇÃO AVALIADA E APROVADA PELA BANCA EM:

20 / 12 / 2019

---

Prof. Dr. André Fernando Lavorante (DQ/UFRPE)

**Orientador(a)**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Ana Paula Silveira Paim (dQF/UFPE)

**Coorientadora**

---

Prof. Dr. José Licarion Pinto Segundo Neto (Titular, membro externo, dQF/UFPE)

**1º Examinador**

---

Prof. Dr. Clécio Souza Ramos (Titular, membro interno, PPGQ/DQ/UFRPE)

**2º Examinador**

**Recife  
2019**

## **AGRADECIMENTOS**

A minha esposa, Luísa Acioli, sem ela eu não teria pensado em realizar este grande feito na minha vida que foi dar sequência aos meus estudos. Por ela sempre me incentivar, estar do meu lado e me ajudar com ideias e companheirismo.

Aos meus pais que sempre me mostraram que estudar é o melhor caminho para crescer.

Aos meus irmãos que sempre estiveram ao meu lado em todas as minhas decisões.

Ao meu orientador, professor André Lavorante, por me dar essa oportunidade e me incentivar a fazer um trabalho cada vez melhor, sempre positivo com a ideia que tudo iria dar certo.

A minha coorientadora, professora Ana Paula Paim, que através do professor também investiu recursos e confiou nesta pesquisa.

Ao professor Jandyson Machado, por me ajudar a melhorar a pesquisa em um momento decisivo.

Aos meus colegas de sala que fizeram os dias do mestrado mais divertidos.

Aos professores do mestrado que me proporcionaram o conhecimento necessário para desenvolver este estudo.

Aos meus colegas de trabalho, que me ajudaram nos momentos em que precisei estudar.

Aos meus superiores do laboratório químico, por me darem a oportunidade de realizar a pesquisa.

## RESUMO

O bisfenol A e os ftalatos são compostos químicos utilizados na produção de polímeros. Estudos comprovam que esses compostos são disruptores endócrinos e ao entrarem em contato com o organismo afetam o sistema hormonal, gerando diversos problemas de saúde ao indivíduo. Desta forma, esta pesquisa tem o objetivo de desenvolver um método para a determinação de bisfenol A e dos ftalatos dibutila (DBP), bis-2-etilhexila (DEHP), di-n-octila (DNOP) e diisodecila (DIDP) em utensílios e brinquedos destinados a lactentes, bem como avaliar a bioacessibilidade destes compostos em saliva artificial. Para isso, foi realizada extração líquida assistida por ultrassom e detecção no HPLC-UV-VIS, a 230 nm. A eluição se deu em modo gradiente liner com uma mistura binária de metanol (solvente B) e água deionizada (solvente A) variando de 70 % B à 93 % B de 3 min à 5 min a uma vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>. A coluna usada foi C18 da Agilent e com tempo total de eluição de 20 min. Após estabelecer os parâmetros de análise, o método foi validado, sendo encontrados limites de detecção de 0,003 à 0,051 mg L<sup>-1</sup> e limites de quantificação de 0,011 à 0,155 mg L<sup>-1</sup> para o bisfenol A e ftalatos analisados. A extração em um sistema ultrassônico foi realizada com clorofórmio sendo otimizada com um planejamento fatorial 2<sup>4</sup>, onde definiu-se as condições ótimas como sendo 1,50 g de amostra em 10 mL de clorofórmio, com tempo de extração no ultrassom de 20 min a 65°C. Ensaio de efeito matriz mostraram que o método não sofre este tipo de interferência e estudos de recuperações apresentaram valores de 73,2 a 103 %. Foram analisadas dez amostras adquiridas no comércio da cidade do Recife-PE, e os resultados apresentaram valores de concentrações de ftalatos entre 0,101 e 30,808 mg Kg<sup>-1</sup>, sendo considerados abaixo dos limites estabelecidos pela ANVISA, e valores de concentração de bisfenol A entre 0,060 e 21,131 mg Kg<sup>-1</sup>. Testes de migração com saliva artificial foram realizados e os resultados mostraram que todas as amostras apresentavam migrações de bisfenol A em concentrações permitidas pela legislação vigente. Em nove amostras foram detectados valores de migração do DBP acima do permitido pela ANVISA. Uma das amostras analisadas revelou incongruências na informação da embalagem, visto que afirmava não possuir ftalatos. O método proposto mostrou ser adequado para análises de disruptores endócrinos em utensílios e brinquedos destinados a lactentes dentro dos parâmetros exigidos pela ANVISA.

**Palavras-chave:** disruptores endócrinos; brinquedos; planejamento fatorial; bioacessibilidade.

## ABSTRACT

Bisphenol A and phthalates are chemical compounds used in the production of polymers. Studies show that these compounds are endocrine disruptors and when in contact with the body affect the hormonal system, generating various health problems to the individual. Thus, this research aims to develop a method for the determination of bisphenol A and dibutyl phthalates (DBP), bis-2-ethylhexyl (DEHP), di-n-octyl (DNOP) and diisodecyl (DIDP) in utensils and toys intended for infants, as well as to evaluate the bioaccessibility of these compounds in artificial saliva. For this, ultrasound assisted liquid extraction and detection on HPLC-UV-VIS at 230 nm were performed. Gradient elution was performed with a binary mixture of methanol (solvent B) and deionized water (solvent A) ranging from 70% B to 93% B from 3 min to 5 min at a flow rate of 1.0 mL min<sup>-1</sup>. The column used was Agilent C18 and had a total elution time of 20 min. After establishing the analysis parameters, the method was validated, finding detection limits of 0.003 to 0.051 mg L<sup>-1</sup> and quantitation limits of 0.011 to 0.155 mg L<sup>-1</sup> for bisphenol A and phthalates analyzed. Extraction in an ultrasonic system was performed with chloroform and optimized with a factorial design 2<sup>4</sup>, where optimal conditions were defined as 1.50 g of sample in 10 mL of chloroform, with ultrasound extraction time of 20 min at 65 °C. Matrix effect tests showed that the method does not suffer this type of interference and recovery studies showed values from 73.2 to 103 %. Ten commercially acquired samples from the city of Recife-PE were analyzed, and the results presented phthalate concentration values between 0.101 and 30.808 mg Kg<sup>-1</sup>, being considered below the limits established by ANVISA, and bisphenol A concentration values between 0.060 and 21.131 mg Kg<sup>-1</sup>. Migration tests with artificial saliva were performed and the results showed that all samples presented bisphenol A migrations in concentrations allowed by the current legislation. In nine samples, DBP migration values were detected above those allowed by ANVISA. One of the samples analyzed revealed inconsistencies in the packaging information as it claimed to have no phthalates. The proposed method has been shown to be suitable for analysis of endocrine disruptors in utensils and toys intended for infants within the parameters required by ANVISA.

Keywords: endocrine disruptors; toys; factorial planning; bioaccessibility.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química geral dos ftalatos.....	20
Figura 2	Representação química de um ftalato com interação eletrostática com a cadeia de PVC.....	22
Figura 3	Tipos de interação das embalagens com o ambiente.....	23
Figura 4	Estrutura química do bisfenol A.....	24
Figura 5	Esquema da síntese do bisfenol A.....	25
Figura 6	Esquema da síntese do policarbonato a partir da reação do bisfenol A e fosfogênio.....	26
Figura 7	Síntese de resinas epóxi.....	26
Figura 8	Principais metabólitos dos ftalatos formados no organismo humano.....	28
Figura 9	Principal metabólito do bisfenol A formado no organismo humano e de roedores.....	29
Figura 10	Reação de derivatização do BPA com BSTFA.....	37
Figura 11	Cromatogramas obtidos comparando o comprimento de onda de 230 nm (em azul) e os comprimentos de onda citados na literatura. a) 201 nm, (b) 220 nm, (c) 260 nm, (d) 277 nm, (e) 280 nm, (f) 307 nm e (g) 350 nm.....	56
Figura 12	Cromatogramas obtidos com eluição isocrática de proporção 95:5 metanol:água (a) e eluição gradiente iniciando na proporção de 70:30 metanol:água (b). Destaque para o sinal interferente da linha de base próximo ao sinal do bisfenol A.....	59
Figura 13	Cromatograma obtido após estabelecer o modo de eluição gradiente da fase móvel metanol: água.....	59
Figura 14	Fluxograma para avaliação de linearidade.....	61
Figura 15	Curvas analíticas obtidas para bisfenol A e ftalatos BBP, DEHP e DNOP na faixa de concentração de 0,5 a 10 mg L <sup>-1</sup> (a) e DIDP na faixa de 5 a 100 mg L <sup>-1</sup> (b).....	62
Figura 16	Gráficos de distribuição de resíduos em função das concentrações de BPA (a), DBP (b), DEHP (c), DNOP (d) e DIDP (e).....	64
Figura 17	Cromatogramas obtidos para bisfenol A e ftalatos com as soluções extratoras de metanol (a), clorofórmio (b) e diclorometano (c).....	69



Figura 18	Gráficos de Normal plot para o BPA (a) e ftalatos DBP (b), DEHP (c), DNOP (d) e DIDP (e).....	72
Figura 19	Curvas analíticas fortificadas obtidas para bisfenol A e ftalatos BBP, DEHP e DNOP na faixa de concentração de 0,5 a 5 mg L <sup>-1</sup> (a) e DIDP na faixa de 5 a 50 mg L <sup>-1</sup> (b).....	75
Figura 20	Avaliação do tempo de extração dos analitos em saliva artificial em função do tempo.....	79

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Algumas das propriedades físico-químicas dos ftalatos com restrições na legislação brasileira.....	21
Tabela 2	Propriedade físico-químicas do bisfenol A.....	25
Tabela 3	Diferentes tipos de ftalatos, limites de migração específica e restrições de uso.....	33
Tabela 4	Análises por cromatografia líquida citadas na literatura.....	35
Tabela 5	Análises por cromatografia gasosa utilizada por alguns autores.....	36
Tabela 6	Relação entre método de extração e detector utilizado.....	40
Tabela 7	Trabalhos envolvendo bioacessibilidade de bisfenol A em brinquedos e utensílios para bebês.....	44
Tabela 8	Trabalhos envolvendo determinação e bioacessibilidade de ftalatos em brinquedos e utensílios para bebês.....	45
Tabela 9	Fatores e valores do planejamento fatorial completo $2^4$ para otimização da extração de bisfenol A e ftalatos em amostras de utensílios para lactentes.....	53
Tabela 10	Parâmetros cromatográficos de qualidade e definição dos picos.....	60
Tabela 11	Dados do teste de Cochran, equação da reta e coeficiente de correlação para as curvas analíticas de BPA, DBP, DEHP, DNOP e DIDP.....	63
Tabela 12	Dados obtidos da ANOVA para bisfenol A e ftalatos.....	65
Tabela 13	Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para bisfenol A e ftalatos.....	66
Tabela 14	Valores de DPR e $HO_R$ por concentração em soluções de referência.....	67
Tabela 15	Concentrações dos compostos (BPA, DBP, DEHP, DNOP e DIDP) extraídos para solução extratora de metanol, clorofórmio e diclorometano.....	70
Tabela 16	Resultados das injeções para o planejamento fatorial completo $2^4$ para otimização da extração de bisfenol A e ftalatos em amostras de utensílios para lactentes a partir do Design Expert.....	71
Tabela 17	Otimização numérica dos parâmetros do planejamento fatorial $2^4$ para o bisfenol A e ftalatos.....	73
Tabela 18	Resultados dos testes F e T para o efeito matriz do bisfenol A e ftalatos.....	75
Tabela 19	Ensaio de recuperação.....	77

Tabela 20	Resultados, em mg Kg <sup>-1</sup> , da determinação do bisfenol A e ftalatos em brinquedos e utensílios para lactentes.....	78
Tabela 21	Resultados, em mg Kg <sup>-1</sup> , da migração na saliva artificial do bisfenol A e ftalatos em brinquedos e utensílios para lactentes.....	80

## LISTA DE SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BBP	Benzil Butil Ftalato
BPA	Bisfenol A
DAD	Detector de Arranjo de Diodo (do inglês, <i>Diode Array Detector</i> )
DAP	Dialil Ftalato
DBP	Dibutil Ftalato
DCHP	Diciclohexil Ftalato
DEHP	Bis-(2-Etilhexil) Ftalato
DEs	Disruptores endócrinos
DEP	Dietil Ftalato
DIBP	Diisobutil Ftalato
DIDP	Diisodecil Ftalato
DINP	Diisononil Ftalato
DLLME	Microextração Líquida Líquida Dispersiva (do inglês, <i>Dipersive Liquid Liquid Microextraction</i> )
DMP	Dimetil Ftalato
DNBP	Di-n-butil Ftalato
DNOP	Di-n-ocitil Ftalato
DNPP	Di-n-propil Ftalato
DOP	Dioctil Ftalato
DPP	Di-n-pentil Ftalato
ECD	Detector por Captura de Elétrons (do inglês, <i>Electron Capture Detector</i> )
FID	Detector por Chama Ionizada (do inglês, <i>Flame Ionization Detector</i> )
FLD	Detector de Fluorescência
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
LLE	Extração Líquida Líquida (do inglês, <i>Liquid Liquid Extraction</i> )
LLME	Microextração Líquida Líquida (do inglês, <i>Liquid Liquid Microextraction</i> )
GC	Cromatografia Gasosa (do inglês, <i>Gas Chromatography</i> )
GCxGC	Cromatografia Bidimensional Abrangente

HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance (do inglês, <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
HS	<i>Headspace</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
MS	Detector de Espectro de Massa (do inglês, <i>Mass Spectrometry</i> )
PEs	Ftalatos (do inglês, <i>Phthalete Esters</i> )
PET	Polietileno Tereftalato
PVC	Policloreto de Vinila
SPE	Extração em Fase Sólida (do inglês, <i>Solid Phase Extraction</i> )
SPME	Microextração em Fase Sólida (do inglês, <i>Solid Phase Microextraction</i> )
UPLC	Cromatografia Líquida de Ultra Performance (do inglês, <i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i> )
UV-Vis	Ultravioleta – Visível

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVOS.....	19
2.1. OBJETIVOS GERAIS.....	19
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	19
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
3.1. FTALATOS .....	20
3.2. BISFENOL A .....	24
3.3. DISRUPTORES ENDÓCRINOS.....	27
3.3.1. Mecanismo de Ação dos Ftalatos e do Bisfenol A como Disruptores Endócrinos no Organismo .....	27
3.3.2. Toxicidade dos Ftalatos .....	29
3.3.3. Toxicidade do Bisfenol A.....	31
3.4. LEGISLAÇÃO BRASILEIRA PARA FTALATOS E BISFENOL A .....	32
3.4.1. Ftalatos .....	32
3.4.2. Bisfenol A.....	34
3.5. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE FTALATOS E BISFENOL A.....	34
3.4.1. Técnicas Cromatográficas .....	34
3.4.2. Métodos de Extração de Ftalatos e Bisfenol A.....	38
3.4.3. Análises de Migração de Ftalatos e Bisfenol A.....	41
3.4.4. Determinação de Ftalatos e Bisfenol A em Brinquedos e Utensílios para Lactentes	43
3.6. VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	46
3.6.1. Curva Analítica e Linearidade.....	46
3.6.2. Análise de Variância.....	47
3.6.3. Limite de Detecção e Quantificação.....	47

3.6.4.	Planejamento Fatorial.....	48
3.6.5.	Precisão e Exatidão.....	49
3.6.6.	Efeito Matriz.....	49
3.6.7.	Ensaio de Recuperação.....	50
4.	MATERIAIS E MÉTODO.....	51
4.1.	SOLUÇÕES ESTOQUE E DE TRABALHO .....	51
4.2.	SOLUÇÕES DE REFERÊNCIA ESTOQUE E DE TRABALHO .....	51
4.3.	EQUIPAMENTOS .....	52
4.4.	AMOSTRAS.....	52
4.4.1.	Pré-tratamento das Amostras.....	53
4.4.2.	Planejamento Fatorial para o Preparo das Amostras.....	53
4.5.	CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	54
4.6.	VALIDAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO .....	55
4.7.	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO NAS AMOSTRAS .....	55
4.8.	AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO .....	55
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	56
5.1.	CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	56
5.1.1.	Seleção do Comprimento de Onda .....	56
5.1.2.	Fase Móvel .....	58
5.2.	VALIDAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO .....	61
5.2.1.	Curva Analítica e Linearidade.....	62
5.2.2.	Análise de Variância (ANOVA).....	64
5.2.3.	Limite de Detecção e de Quantificação.....	66
5.2.4.	Precisão.....	67
5.3.	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DO MÉTODO PROPOSTO.....	68
5.3.1.	Avaliação da escolha do solvente.....	68

5.3.2. Planejamento Fatorial.....	70
5.4. VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	74
5.4.1. Efeito Matriz.....	74
5.4.2. Teste de Adição e de Recuperação.....	76
5.5. ANÁLISE DAS AMOSTRAS.....	77
5.6. ANÁLISE DE MIGRAÇÃO COM SALIVA ARTIFICIAL.....	79
6. CONCLUSÃO.....	82
7. PERSPECTIVAS.....	84
REFERÊNCIAS.....	85
ANEXOS.....	94



## 1. INTRODUÇÃO

Os materiais plásticos têm uma vasta possibilidade de utilização devido à flexibilidade de suas características e nos últimos anos sua fabricação tem sido cada vez maior. Materiais de uso na construção civil, utensílios domésticos, brinquedos infantis e embalagens são alguns exemplos de produtos que utilizam polímeros.

Com os avanços tecnológicos, cada vez mais tem-se buscado aprimorar e desenvolver novos polímeros. Os aditivos utilizados na manufatura dos mesmos, adicionam características específicas podem ser satisfatoriamente biorresistentes ou de natureza fungicida ou bactericida (KELEN, 1983). Dentre os aditivos, os mais usados são os plastificantes, corantes, estabilizantes e lubrificantes.

O bisfenol A é um monômero utilizado principalmente na composição do policarbonato e da resina epóxi, podendo também ser utilizado como aditivo na fabricação de polímeros. Na temperatura ambiente é um sólido branco com baixa solubilidade em água. Os ftalatos são um grupo de diésteres usados como aditivos, que proporcionam ao polímero mais flexibilidade, maciez, transparência, durabilidade e resistência a chamas. São, em geral, líquidos viscosos com baixa solubilidade em água podendo mudar as características de acordo com o tamanho da sua cadeia (OLIVEIRA, 2013).

O bisfenol A e os ftalatos são considerados disruptores endócrinos, pois ao entrarem no organismo de animais e humanos afetam o sistema hormonal causando distúrbios nas funções fisiológicas. Podem causar doenças relacionadas à fertilidade, má formação dos órgãos sexuais e embriões, bem como problemas comportamentais devido aos distúrbios hormonais causados por esses agentes.

Pesquisas foram realizadas em animais com a intenção de detectar os danos causados por esses compostos como os mostrados por Montagner (2013) e Moreira (2014). Otero (2014) e Oliveira (2013) apresentaram resultados que demonstraram que os disruptores endócrinos causam distúrbios fisiológicos e/ou hormonais em seres humanos.

Devido a comprovação dos malefícios trazidos por esses compostos, pesquisas foram desenvolvidas com o intuito de aprimorar a análise desses compostos nos mais diferentes tipos de matrizes (SÁ, 2013). A cromatografia líquida é a técnica mais utilizada para análise do bisfenol A devido à facilidade de detecção, que pode ser melhorada através de técnicas de extração adequadas. Outro fator que indica a preferência pela cromatografia líquida ao invés da gasosa é a necessidade da derivatização do bisfenol A para que o composto possa apresentar

uma melhor volatilização. Os ftalatos, por sua vez, apresentam bons resultados na determinação com a utilização de cromatografia gasosa, já que boa parte dos ftalatos de cadeias secundárias pequenas possuem uma boa volatilidade.

Os procedimentos de extração dos analitos, além das técnicas cromatográficas, também são de grande importância na determinação desses compostos. A escolha do método de extração vai depender da matriz da amostra, sendo necessário a utilização de técnicas mais complexas, como por exemplo, a microextração em fase sólida (do inglês, *Solid Phase Micro Extraction, SPME*) (SÁ, 2013).

No que diz respeito aos métodos oficiais para determinação de bisfenol A e ftalatos, a ANVISA propõe que as análises de migração específica do bisfenol A sejam realizadas por técnicas cromatográficas e que o método seja validado e sensível ao limite estabelecido. Já os ftalatos possuem um método proposto pela ABNT (2018) no qual se utiliza da cromatografia gasosa podendo ser acoplado um detector de massas (do inglês, *Mass Spectrometry, MS*) ou um detector de ionização de chama (do inglês, *Flame Ionization Detector, FID*). A ABNT fornece dois métodos de extração sendo um via soxhlet e o outro com a utilização do tetrahidrofurano.

Em função dos problemas causados por esses compostos foram criadas leis que restringem o uso em brinquedos e utensílios para lactentes (crianças com até 24 meses de idade). Para os ftalatos, o INMETRO, através da portaria 369/2007, estabelece a adição máxima de 0,1% em massa de ftalato por massa de brinquedo. A resolução da ANVISA (nº 17, 2008) estabelece limites de migração específica para os ftalatos butil benzila, dibutila, dicitlohexila, dietila, diisodecila, di-2-etilhexila e dioctila. De acordo com a resolução da ANVISA RDC nº 41, de 16 de setembro de 2011, o bisfenol A possui apenas limites de migração específica de 0,6 mg Kg<sup>-1</sup> para mamadeiras destinadas à alimentação de lactentes.

Com o intuito de desenvolver novas possibilidades de análise desses compostos, com limites adequados aos parâmetros exigidos pela legislação brasileira, esta pesquisa propõe um método unificado de determinação de bisfenol A e ftalatos como alternativa aos já existentes. Para tanto, utilizou-se da cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, *High Performance Liquid Chromatography, HPLC*) acoplada a um detector UV-VIS para a determinação do bisfenol A e dos ftalatos, dibutil ftalato (DBP), bis-2-etilhexila (DEHP), di-n-octila (DNOP) e di-isodecila (DIDP), em brinquedos e utensílios destinados a lactentes encontrados no comércio da cidade do Recife – PE.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVOS GERAIS**

Desenvolver um método analítico para determinação de ftalatos e bisfenol A em brinquedos e utensílios para lactentes e avaliar a bioacessibilidade desses compostos.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

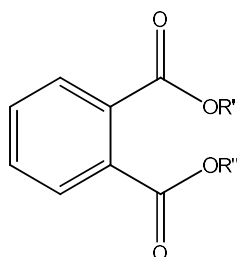
- Desenvolver um método analítico para determinação de ftalatos DBP, DEHP, DNOP e DIDP e de bisfenol A empregando a extração líquido-líquido assistida por ultrassom com injeção em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detector UV-VIS.
- Validar o método analítico atendendo as normas da ANVISA do *Guia para Tratamento Estatístico de Validação Analítica* (nº10/2017).
- Determinar o teor dos analitos em brinquedos e utensílios para lactentes comercializados no comércio da cidade do Recife-PE, Brasil.
- Realizar teste de migração com saliva artificial para verificação de bioacessibilidade de ftalatos e bisfenol A nas amostras de utensílios e brinquedos para lactentes.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. FTALATOS

Os ftalatos são um grupo de compostos químicos derivados do ácido orto-ftálico, são diésteres que apresentam a estrutura química geral mostrada na figura 1. São produzidos pela esterificação do anidrido ftálico com álcoois de cadeia carbônica com comprimentos e estrutura de acordo com a cadeia do álcool utilizado. Essa reação ocorre em duas etapas, a primeira reação é rápida, irreversível e resulta na formação de monoésteres por alcoólise do ácido ftálico. A segunda reação envolve a formação do di-éster na presença de um catalisador ácido a temperaturas na faixa de 140-165 ° C. O ftalato é então purificado por destilação a vácuo ou carvão ativado (ZAKI, 2015).

**Figura 1 – Estrutura química geral dos ftalatos**

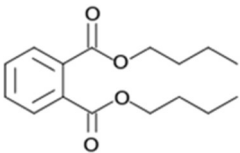
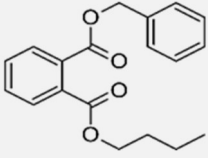
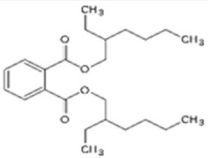
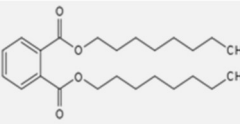
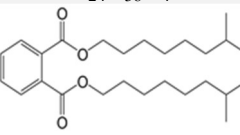
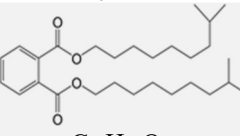


Fonte: Autor.

A maioria dos ftalatos em condições normais de temperatura e pressão é um líquido incolor viscoso, pouco solúvel em água, mas solúvel em óleo ou solventes orgânicos e com volatilidade moderada (OLIVEIRA, 2013). Entretanto, à medida que os substituintes são trocados por estruturas maiores essas propriedades podem mudar, como pode ser verificado na tabela 1.

Em razão das múltiplas aplicações e demanda crescente, os ftalatos têm sido usados em grande escala desde a década de 1950, se constituindo como um dos produtos químicos mais produzidos do mundo com produção global de 6 milhões de toneladas/ano (AMANZADEH, 2016). Em 1970, dois pesquisadores relataram a ocorrência de ftalatos em células do sangue, tecidos e órgãos humanos de receptores de transfusões de sangue, desde então vários estudos examinaram a migração, a toxicidade e os efeitos dos ftalatos no meio ambiente (CHEN, 2013).

**Tabela 1 – Algumas das propriedades físico-químicas dos ftalatos com restrições na legislação brasileira**

Nome comum e sigla	CAS	Estrutura e fórmula	Massa molecular em g/mol	Ponto de ebulição em °C	Ponto de inflamação em °C	Solubilidade em água em mg/L em 25 °C	Log P
<b>Ftalato de Dibutila (DBP)</b>	84-74-2	 C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	278,34	340	171	11,2	4,7
<b>Ftalato de Benzilbutila (BBP)</b>	85-68-7	 C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	312,36	235	113	2,69	4,9
<b>Ftalato de bis (2-etilhexila) (DEHP)</b>	117-81-7	 C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	390,56	385	195	0,27	7,4
<b>Ftalato de di-n-octila (DNOP)</b>	117-84-0	 C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	390,56	220	109	0,022	9,1
<b>Ftalato de di-isononila (DINP)</b>	2855-3-12-0	 C <sub>26</sub> H <sub>42</sub> O <sub>4</sub>	418,62	413	220	0,2	9,6
<b>Ftalato de di-isodecila (DIDP)</b>	2676-1-40-0	 C <sub>28</sub> H <sub>46</sub> O <sub>4</sub>	446,67	250	240	0,28	10,6

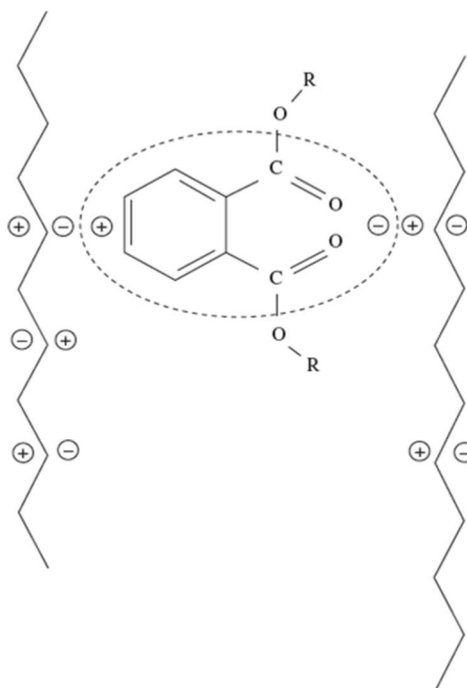
Fonte: Ficha de Informação de Segurança para Produtos Químicos (FISPQ) da Merck, Brisco e PubChem. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/>. Acesso em 15 maio de 2019.

Os ftalatos são muito utilizados como plastificantes, ou seja, funcionam como aditivos em materiais plásticos como Policloreto de vinila (PVC), Polietileno tereftalato (PET) e outros tipos de polímeros, tais como borrachas, estirenos, resinas epóxi e plásticos de acetato de celulose (ZAKI, 2015). Os materiais com a adição dos ftalatos podem ser utilizados para revestimento de pavimentos, dispositivos medicinais, cosméticos, adesivos, colas, adjuvantes agrícolas, produtos de higiene pessoal, detergentes, tintas, têxteis, embalagens de alimentos, borracha e brinquedos (BAZÍLIO, 2014; LV, 2017; OLIVEIRA, 2013; SIRILE, 2017). Segundo Beltrán (2017), os ftalatos contribuem gerando mais flexibilidade, maciez, transparência e

durabilidade e Eskandarpour (2017) também menciona resistência a chamas. O DEHP é o ftalato mais utilizado devido a melhor relação custo benefício, tendo uma representação expressiva de 80% como o plastificante no PVC (BAZÍLIO, 2014).

As teorias da lubrificação e do gel desenvolvidas por Kirk-Patrick et al e Doolittle (apud ZAWADZKI, 2009, p. 264), respectivamente, são as duas teorias principais que procuram explicar a ação do plastificante sobre o PVC. A teoria da lubrificação afirma que o plastificante atua como lubrificante diminuindo a resistência do polímero à deformação como resultado da diminuição do atrito intermolecular existente entre os segmentos poliméricos. A teoria do gel propõe que os plastificantes atuam sobre as ligações dipolo-dipolo e forças de *van der Waals*. Os ftalatos ficam entre as moléculas de PVC, dessa forma aumentam a distância entre as cadeias poliméricas. A força de atração eletrostática é inversamente proporcional à distância entre as cargas elétricas, sendo assim, o aumento da distância intermolecular atenua a força de atração que “quebra” as ligações dipolo-dipolo entre as cadeias, criando novos dipolos entre o PVC e o plastificante. Leuchs (apud ZAWADZKI, 2009, p. 264) propõe que as cargas eletrostáticas são minimizadas pela presença do aditivo como visto na figura 2. Com o aumento da distância entre as cadeias poliméricas do PVC cresce a flexibilidade e a resistência a temperaturas devido a transição vítrea de polímeros (ZAKI, 2015).

**Figura 2 – Representação química de um ftalato com interação eletrostática com a cadeia de PVC**

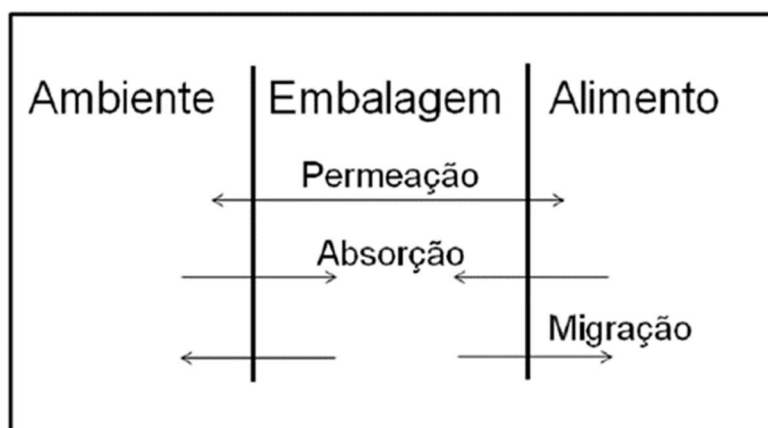


Os ftalatos podem ser transferidos facilmente de materiais plásticos para o ambiente circundante, porque eles estão fisicamente, e não quimicamente, ligados à matriz polimérica (AMANZADEH, 2016; OLIVEIRA, 2013). A transferência dos plastificantes para o meio externo pode modificar propriedades do material plástico como resistência química e mecânica. Em caso de embalagens plásticas de alimentos, a transferência dos plastificantes pode modificar as propriedades dos alimentos e trazer consequências toxicológicas ao consumidor (OLIVEIRA, 2013).

Os materiais plásticos podem perder os ftalatos para o ambiente por migração, extração e volatilização. A migração ocorre quando o material plástico está em contato com o ambiente, com alimentos, com água, com saliva, ou seja, é a transferência do ftalatos entre duas superfícies que estão em contato. Na extração, a perda ocorre geralmente de modo proposital, para fins analíticos, onde o plástico é exposto a um composto líquido para ser analisado quali ou quantitativamente. A perda de ftalatos por volatilização pode ser utilizada com objetivo analítico através de técnicas cromatográficas ou pode ocorrer naturalmente pela exposição do material à temperatura ambiente (OLIVEIRA, 2013).

Os materiais plásticos ou embalagens plásticas podem sofrer três tipos de interação de contato: a permeação, a absorção e a dessorção ou migração (figura 3). A permeação é a transferência do composto do material para o alimento e vice-versa, a absorção é a sorção de compostos externos para o interior do material plástico e a migração é a liberação de compostos do material para o meio externo (BAZILIO, 2014; OLIVEIRA, 2013).

**Figura 3 – Tipos de interação das embalagens com o ambiente**



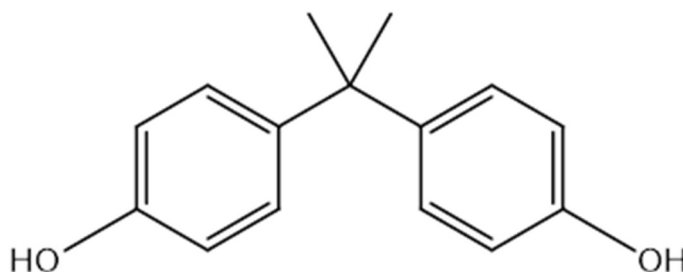
Fonte: Oliveira, W. S.; 2013.

Nessas interações de contato, também chamadas de difusão, ocorre a transferência de massa resultante de movimentos moleculares espontâneos e naturais. A difusão pode ter a sua cinética modificada de acordo com as características do material plástico, tais como: tipo do polímero, espessura do polímero, concentração do plastificante. Além dessas condições, a cinética também pode sofrer alterações pelo meio externo, por exemplo, pelo contato com alimentos, que irá facilitar a transferência dos ftalatos a uma razão determinada pelo coeficiente de Nerst (BAZILIO, 2014). Outras variáveis como a temperatura, a umidade relativa, a geometria das embalagens e as características dos alimentos também tem influência no processo de difusão dos ftalatos, modificando a taxa de liberação (OLIVEIRA, 2013).

### 3.2. BISFENOL A

Os bisfenóis fazem parte da classe dos difenilalcanos. O bisfenol A, denominado 2,2-bis(4,4 dihidroxifenil) propano (Figura 4) é o mais importante devido à suas aplicações, se constituindo como um dos produtos químicos de maior volume de produção mundial (REZG, 2014).

**Figura 4 - Estrutura química do bisfenol A**



Fonte: Autor.

O bisfenol A foi descrito primeiramente por Dianin, em 1891, e foi sintetizado pela primeira vez por Zincke em 1905. Esse composto apresenta baixa solubilidade em água, baixa pressão de vapor, baixa volatilidade e está no estado sólido à temperatura ambiente (HUANG, 2011). Algumas características do bisfenol A são mostradas na tabela 2.

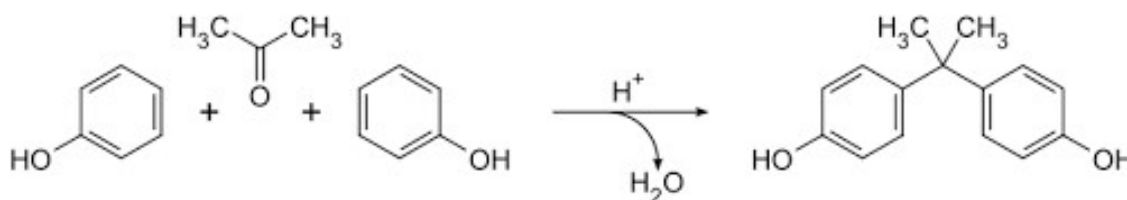


**Tabela 2 – Propriedades físico-químicas do bisfenol A**

Nome comum e sigla	CAS	Fórmula	Massa molecular em g/mol	Ponto de ebulição em °C	Ponto de inflamação em °C	Solubilidade em água em mg/L em 25 °C	Densidade em g/mL à 25 °C
<b>BPA (BISFENOL A)</b>	80-05-7	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	228,28	220	227	300	1,2

Fonte: Ficha de Informação de Segurança para Produtos Químicos (FISPQ) da Merck, Brisco e PubChem. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/>. Acesso em 15 maio de 2019.

O bisfenol A pode ser sintetizado pela condensação em meio ácido de acetona com dois grupos fenol, como pode ser observado na figura 5.

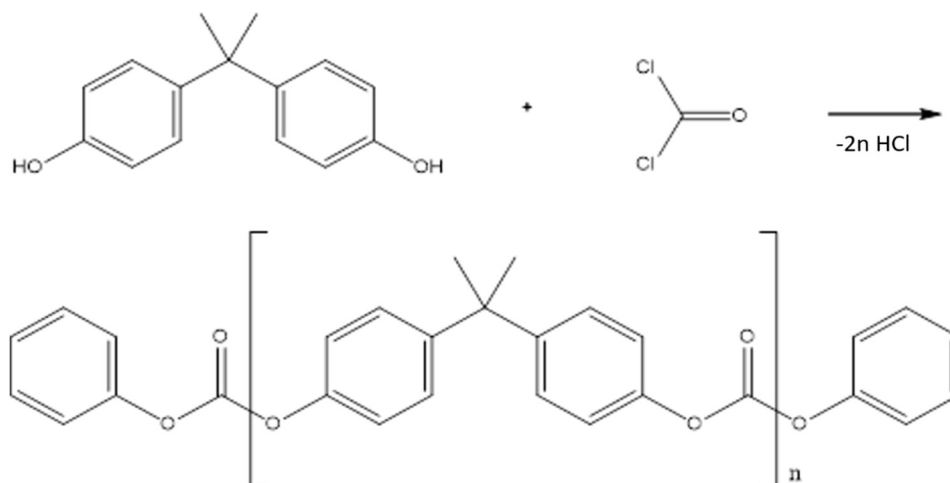
**Figura 5 – Esquema da síntese do bisfenol A**

Fonte: Autor.

O bisfenol A é usado principalmente para sintetizar policarbonato e resina epóxi. O policarbonato é formado pela reação do bisfenol A com fosfogênio (Figura 6) levando à polímeros com alta resistência térmica e mecânica. Essa característica, juntamente com o fato de ser transparente, proporciona sua utilização em muitos materiais, tais como embalagens recicláveis para armazenamento de alimentos e bebidas, mídias óticas como CDs e DVDs, equipamentos automotivos, equipamentos elétricos e eletrônicos, equipamentos médicos, equipamentos esportivos, dentre outros (GALLIMBERTI, 2018).

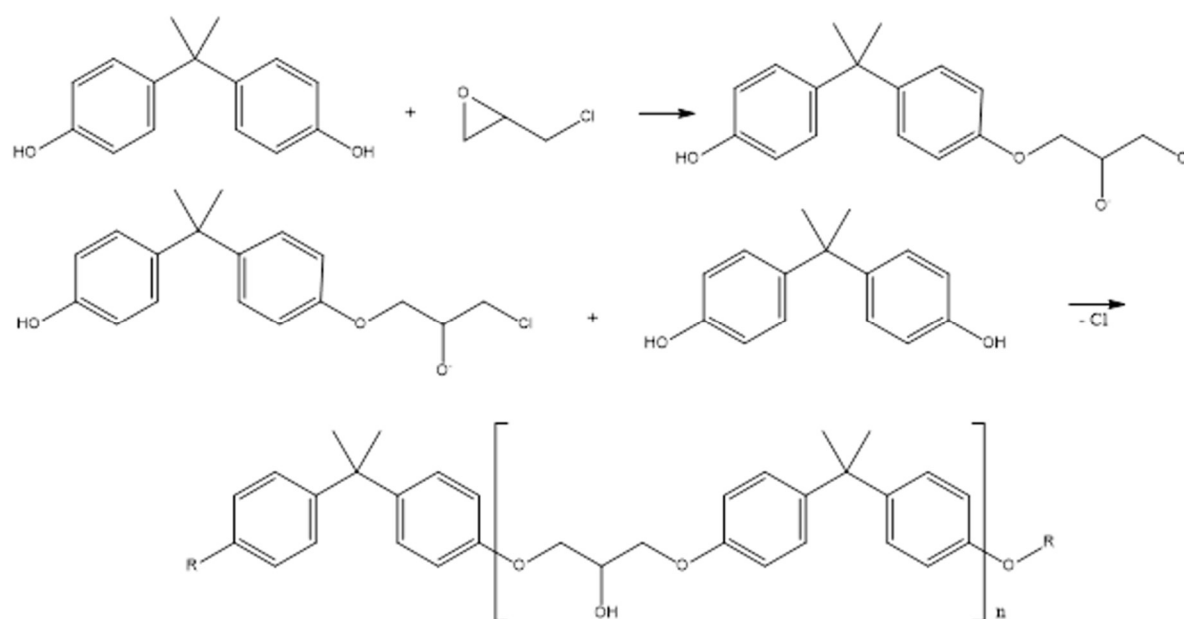
As resinas epóxi, que são formadas a partir da condensação do bisfenol A com a epicloriglicina para formar bisfenol A diglicil éter (Figura 7) também possuem diversas aplicações. Elas podem ser utilizadas como revestimento interno de proteção em latas de alimentos e bebidas, em tintas para diversos usos, em placas de circuito impresso como em computadores e em várias outras utilizações para trazer resistência à materiais como por exemplo, na construção civil.

**Figura 6 – Esquema da síntese do policarbonato a partir da reação do bisfenol A e fosfogênio**



Fonte: Autor.

**Figura 7 – Síntese de resinas epóxi**



Fonte: Autor.

Segundo Altannak (2015), o bisfenol A pode ser utilizado como monômero da resina (policarbonato), ou seja, como parte do material fabricado. Entretanto, ele também pode ser utilizado como aditivo. No papel térmico, por exemplo, o bisfenol A atua como inibidor da polimerização do cloreto de vinila, como agente antioxidante e antichamas. O composto também pode ser utilizado em brinquedos e utensílios para crianças como aditivo no polivinilcloreto (PVC) (JÚNIOR, 2012; HUANG, 2011).

Quando o bisfenol A é usado em materiais plásticos como aditivo, sua liberação para o meio segue a mesma lógica descrita para os ftalatos, visto que eles possuem o mesmo tipo de interação na estrutura (LINHARES JÚNIOR, 2012). Entretanto, para materiais em que o bisfenol A faz parte da cadeia polimérica, a liberação para o meio pode ocorrer por fotodegradação, termodegradação, degradação química, biodegradação, degradação mecânica e por radiações ionizantes (QUEIROZ, 2012).

### **3.3. DISRUPTORES ENDÓCRINOS**

Os disruptores endócrinos (DEs) são compostos químicos de origem natural ou sintética, que interferem na síntese, secreção, transporte, ligação ou eliminação de hormônios naturais do corpo. Podendo causar danos à saúde do indivíduo e comprometer a manutenção da homeostase, a reprodução, o desenvolvimento e/ou o comportamento (KABIR, 2015). Os ftalatos e o bisfenol A se constituem como DEs.

Os efeitos dos DEs estão associados diretamente ao sistema endócrino, que é constituído por uma série de glândulas que produzem hormônios, os quais irão viajar pela corrente sanguínea para regular várias funções do corpo. Os hormônios se ligam as proteínas especiais receptoras, sem elas os hormônios não podem realizar suas funções no organismo (MOREIRA, 2014). O coração, o fígado, o intestino, os rins, os músculos e até a gordura corporal são também parte do sistema endócrino, realizando funções secundárias, secretando hormônios.

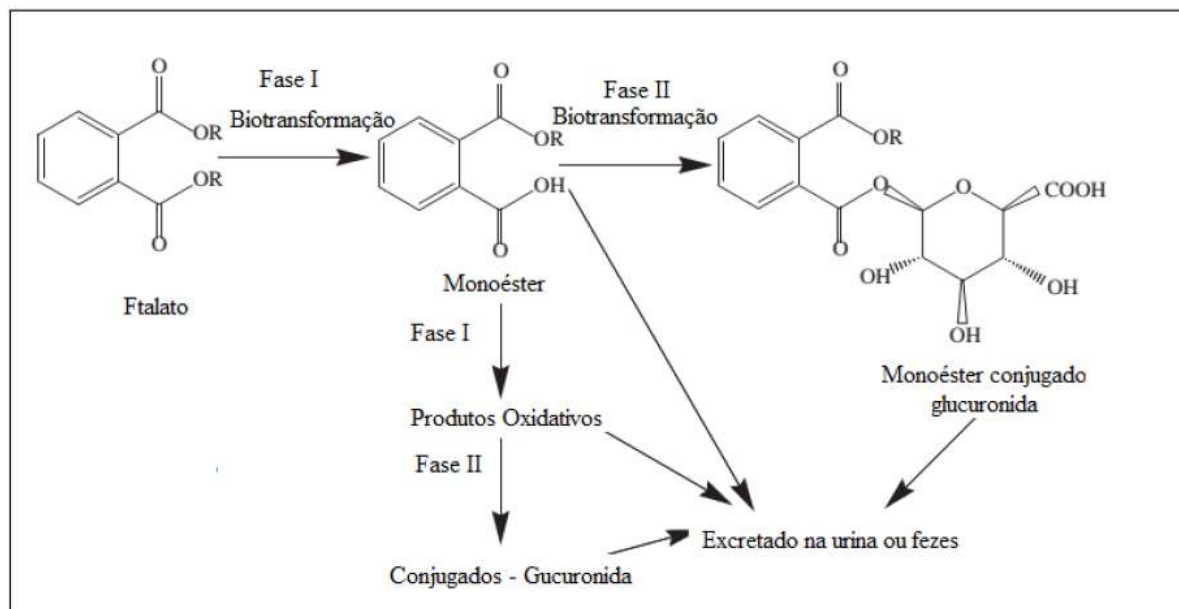
Os DEs são compostos utilizadas em pesticidas, esteroides sintéticos ou naturais, fármacos, cosméticos, entre outros produtos (SILVA, 2013). O corpo humano pode ser exposto aos DEs por via oral, por meio de ingestão de alimentos ou água contaminados, por inalação, por contato com a pele e por meio biológico através da gestação e da amamentação (GORE, 2014).

#### **3.3.1. Mecanismo de Ação dos Ftalatos e do Bisfenol A como Disruptores Endócrinos no Organismo**

Os ftalatos não são bioacumulativos e rapidamente são metabolizados no intestino em monoésteres através das enzimas hidrolase hepáticas ou pancreáticas. Os ftalatos apresentam tempo de meias-vidas curtas que variam de 4 a 24 horas, sendo, posteriormente, excretados pela urina e fezes. Cerca de 70% dos ftalatos excretados na urina são metabólitos dos ftalatos de baixo peso molecular, de 2 a 7% são ftalatos de alto peso molecular, e o restante são metabólitos

mais hidrofílicos e oxidativos. Os monoésteres e os metabólitos secundários oxidativos dos ftalatos são excretados inalterados ou na forma de conjugados glicurônicos como pode ser observado na figura 8 (OLIVEIRA, 2013; ZAKI, 2015).

**Figura 8 – Principais metabólitos dos ftalatos formados no organismo humano**



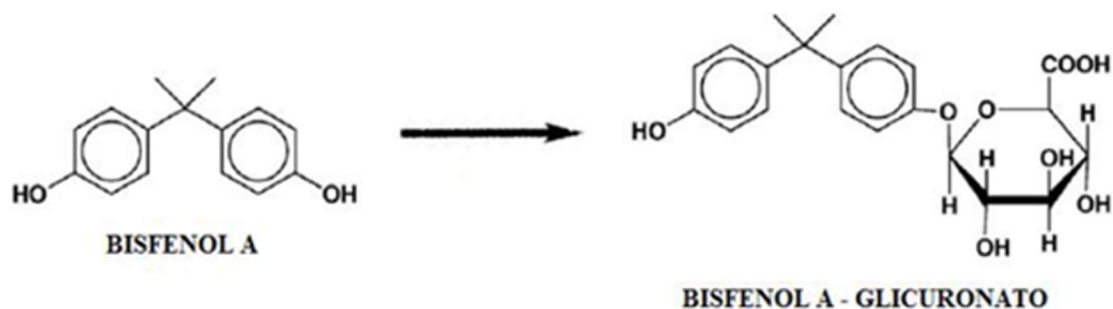
Fonte: Moreira, M. A.; 2014.

Os monoésteres formados são metabólitos tóxicos e são facilmente absorvidos na corrente sanguínea onde irão interferir nas funções hormonais por três mecanismos de ação diferentes (MOREIRA, 2014). No primeiro mecanismo os ftalatos atuam como DEs imitando a função dos hormônios naturais, desencadeando reações químicas semelhantes. No segundo mecanismo, ocorre o bloqueio dos receptores hormonais impedindo a ação dos hormônios naturais. No terceiro mecanismo os ftalatos afetam a síntese, o transporte, a metabolização e a excreção dos hormônios naturais ao alterar as suas concentrações (MOREIRA, 2014; TELEGINSKI, 2016).

Os ftalatos causam efeitos diferentes no metabolismo de crianças e adultos, sendo as crianças mais sensíveis, por estarem na fase de desenvolvimento dos sistemas e órgãos do corpo. Entretanto, os recém-nascidos são menos sensíveis, visto que a enzima que catalisa os metabólitos está praticamente ausente no organismo (OLIVEIRA, 2013; SÁ, 2013).

O bisfenol A possui um tempo de vida no organismo bem curto, cerca de 6 horas, dessa forma ele não é bioacumulativo, possuindo uma rápida biotransformação, na qual reage com o ácido glicurônico para formar o metabólito glicuronato que é excretado pela urina (Figura 9).

**Figura 9 – Principal metabólito do bisfenol A formado no organismo humano e de roedores**



Fonte: Adaptado de Linhares Júnior, G. F. L.; 2012.

Além de ser encontrado na urina o bisfenol A também pode ser encontrado no plasma, no fluido folicular, no sêmen, no líquido amniótico, na saliva, no leite materno e no tecido adiposo, tendo como principal biomarcador o bisfenol A – glicuronato presente na urina como mostrado na figura 9 (BRIGANTE, 2015; LINHARES JÚNIOR, 2012).

O bisfenol A é o mais comum DEs com características estrogênicas, agindo de forma a mimetizar a ligação ao receptor estrogênico, causando alterações neurocomportamentais e sexuais, principalmente em estágios de desenvolvimento do indivíduo (BRIGANTE, 2015; MONTAGNER, 2013; OTERO, 2014). Também possui a capacidade de ligar-se a outros receptores hormonais causando efeitos nocivos e interferindo na insulina, leptina, tiroxina e em hormônios sexuais (BRIGANTE, 2015).

### 3.3.2. Toxicidade dos Ftalatos

Diversos estudos têm sido realizados para determinar os efeitos dos ftalatos no organismo através do sistema endócrino, tais estudos reportaram experimentos *in vitro*, em animais e análises diretas nos humanos avaliando os efeitos causados por exposição aos DEs. Esses efeitos puderam ser avaliados através dos metabólitos presentes nos fluidos biológicos como sêmen, urina e fezes, comparando as concentrações dos DEs nesses fluidos com as alterações causadas no organismo humano. Exposições crônicas tem maior relação com a causa da disfunção no sistema endócrino (MOREIRA, 2014).

Estudos realizados em animais mostram que ftalatos podem causar alterações nos rins, fígado e má formação fetal (MOREIRA, 2014). A exposição aos múltiplos ftalatos em baixas concentrações agem de forma aditiva, ou seja, todos os ftalatos absorvidos irão causar efeitos

nocivos, mesmo que não atuem de forma semelhante (SWAN, 2008). A exposição contínua de ftalatos de diversas concentrações à ratos machos e fêmeas, permitiu observar que a menor dose de ftalatos que causou efeitos embriotóxicos em crias foi de 52 mg Kg<sup>-1</sup> e 80 mg Kg<sup>-1</sup> de massa corporal por dia para machos e fêmeas, respectivamente (OLIVEIRA, 2013).

Em estudos realizados através da ingestão do DEHP em ratos e camundongos, com a finalidade de avaliar a toxicidade deste ftalato, observou-se atrofia testicular, tumores no fígado, danos ao cérebro, rins e diminuição da estrutura pulmonar, trazendo perdas respiratórias aos camundongos (OLIVEIRA, 2013). Ainda que muitos dos efeitos encontrados em animais tenham sido encontrados em humanos, essas semelhanças são limitadas pelas diferenças entre o organismo humano e animal (SWAN, 2008).

A exposição de altas doses de ftalatos às mulheres grávidas pode causar uma alta incidência de abortos e má formações dos fetos, como fissura de palato e deformações esqueléticas. Os ftalatos podem também atravessar a placenta e alojar-se no leite materno, resultando em más formações reprodutivas fetais, afetando os testículos, prejudicando a produção de espermatozoides e causando defeitos congênitos, especialmente no pênis (SWAN, 2008). Essa exposição pré-natal pode influenciar, diante da alteração hormonal, no desenvolvimento mental, psicomotor e comportamental do indivíduo (OLIVEIRA, 2013).

Estudos epidemiológicos mostram que a exposição aos ftalatos resulta em alteração hormonal, infertilidade, trabalho de parto prematuro, diminuição da distância anogenital, diminuição da contagem e qualidade dos espermatozoides em crianças do sexo masculino e desenvolvimento prematuro das mamas em crianças do sexo feminino. As alterações hormonais tireoidianas aumentam a obesidade abdominal, a resistência à insulina, a asma e sintomas alérgicos respiratórios (ZAKI, 2015).

Silva (2013) mostra que alterações na diferenciação sexual de indivíduos em desenvolvimento, que levam a feminização de indivíduos machos e vice-versa, bem como danos a fertilidade, como perda de qualidade de sêmen e redução do desenvolvimento de folículos ovarianos em adultos, são efeitos causados pela exposição à disruptores endócrinos.

Apesar de muitos estudos associarem a toxicidade dos DEs à alguns efeitos no organismo, há trabalhos que não apontam os mesmos efeitos. No estudo realizado por Chevrier (2012), por exemplo, não foram encontradas anomalias genitais em crianças que sofreram exposição pré-natal à ftalatos. Para Lomenick (2010) embora a exposição aos ftalatos possa trazer alguns efeitos tóxicos, estes não estão associados à puberdade precoce em crianças do sexo feminino.

### 3.3.3. Toxicidade do Bisfenol A

Pesquisas realizadas em animais por Montagner (2013) e Linhares Júnior (2012) revelaram a feminilização de peixes expostos à produtos químicos que possuem DEs. As mudanças comportamentais, sexuais e mutações genéticas associadas à abortos e à mal de Parkinson em ratos e redução de massa corpórea e de órgãos em camundongos expostos ao bisfenol A também foram observados.

Estudos epistemológicos associam diabetes, obesidade, aumento de gordura visceral, hipertensão e doenças coronárias à exposição ao bisfenol A. A exposição materna ao bisfenol A também apresenta grande risco, já que além de afetar a mãe, pode afetar o feto pela passagem do composto através da barreira placentária, causando alterações neurais, comportamentais, desordem imunológicas e sexuais (BRIGANTE, 2015; MONTAGNER, 2013; OTERO, 2014; REZG, 2014; TELEGINSKI, 2016). Essa exposição precoce também está associada à efeitos nocivos como a diminuição da produção de esperma, liberação de prolactina, aumento das células de câncer de mamas, má formação dos aparelhos reprodutivos masculino e feminino, entre outros (MONTAGNER, 2013; OTERO, 2014).

Otero (2014) mostra em outro estudo, que a exposição das mulheres ao bisfenol A, dentro dos limites permitidos pelas autoridades europeias (*European Food Safety Authority*), reduziu o número de ovócitos, afetando a fertilidade e dobrando o risco de gestação de bebês com síndrome de Down.

Doenças cardíacas, renais e respiratórias em crianças, problemas de desenvolvimento do cérebro, risco de hiperplasia, risco de câncer endometrial, imunodeficiência e aumento do peso da próstata também são danos causados pela exposição ao bisfenol A. Podemos observar que grande quantidade de doenças está associada a este composto, entretanto, é relevante destacar que muitas delas não tiveram seu mecanismo de ação elucidado (HUANG, 2011; OTERO, 2014; REZG, 2014).

### **3.4. LEGISLAÇÃO BRASILEIRA PARA FTALATOS E BISFENOL A**

Pesquisas apresentadas anteriormente mostram os danos causados pelos ftalatos e bisfenol A, por essa razão, foi necessária a regulamentação desses compostos por órgãos responsáveis, com o intuito de restringir seu uso em produtos específicos.

#### **3.4.1. Ftalatos**

Em 1999, a União Europeia proibiu o uso de ftalatos em brinquedos de crianças, de até 3 anos de idade, que possam ser levados a boca. Neste mesmo ano, a ANVISA estabeleceu através da Resolução nº 105 que as embalagens com plastificantes não podem conter mais de 1% em peso de ftalato de dibenzila.

O Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) fez novas alterações quanto ao uso de ftalatos através da Portaria 369/2007, estabelecendo requisitos para aceitação e ensaio de ftalatos em brinquedos de material vinílico. Os ftalatos não devem ser utilizados como compostos ou componentes de preparações em concentrações superiores a 0,1% em massa de material plastificado de brinquedos, sendo os DEHP, DBP e BBP proibidos em todos os tipos de brinquedos, e os DINP, DIDP e DNOP proibidos em brinquedos destinados às crianças com idade inferior a 3 anos.

A resolução da ANVISA nº 17 de 17 de março de 2008 dispõe a regulamentação técnica sobre a lista positiva de aditivos para materiais plásticos destinados à elaboração de embalagens e equipamentos em contato com alimentos. Essa resolução apresenta os limites de migração específica (LME), limites de concentrações em produto final e limites de forma de utilização para vários compostos utilizadas em embalagens, dentre elas estão os seguintes ftalatos mostrados na tabela 3 com suas respectivas restrições.

Esta ainda é a regulamentação nacional utilizada até a apresentação desta pesquisa. Apenas o estado do Rio de Janeiro criou o projeto de lei 1.310/08 através da Assembleia Legislativa que proíbe o uso do composto ftalato em brinquedos e mordedores para bebês fabricados no estado.



**Tabela 3 – Diferentes tipos de ftalatos, limites de migração específica e restrições de uso**

Nome do produto	LME (mg Kg <sup>-1</sup> )	Uso
<b>Ftalato de Butila e Benzila</b>	30	a) Como plastificante em materiais reutilizáveis; b) Como plastificante em materiais de um único uso que estejam em contato com alimentos não gordurosos, exceto para preparados para lactantes e preparados de continuação; c) Como coadjuvante de tecnologia em concentrações de até 0,1% no produto final.
<b>Ftalato de Dibutila</b>	0,3	a) Como plastificante em materiais reutilizáveis que estejam em contato com alimentos não gordurosos; b) Como coadjuvante de tecnologia em poliolefinas em concentrações de até 0,05% no produto final.
<b>Ftalato de Diciclohexila</b>	5 % m/m*	a) Em adesivos; b) Como plastificante em polivinil acetato, policloreto de vinila e copolímeros de cloreto de vinila, sozinho ou combinado com outros ftalatos, sempre que a quantidade total dos mesmos não supere 10% expresso como ácido ftálico, para filmes em contato com alimentos a temperatura ambiente ou menor
<b>Ftalato de Dietila</b>	5 % m/m*	a) Em adesivos; b) Como componente de recobrimentos resinosos e poliméricos.
<b>Ftalato de Diisodecila</b>	9	a) Como plastificantes em materiais reutilizáveis; b) Como plastificante em materiais de um único uso que estejam em contato com alimentos não gordurosos, exceto para preparados para lactantes e preparados de continuação; c) Como coadjuvante de tecnologia em concentrações de até 0,1% no produto final.
<b>Ftalato de Di-2-Etilhexila</b>	1,5	a) Como plastificante em materiais e objetos reutilizáveis que estejam em contato com alimentos não gordurosos; b) Como agente de apoio ao processo em concentrações de até 0,1% no produto final.
<b>Ftalato de Dioctila</b>	5 % m/m*	Somente para ser usado: a) Em adesivos; b) Como lubrificante em resinas de melamina formaldeído.

\* Para alimentos com conteúdo de gordura superior a 5% somente está permitido o uso de quantidades inferiores a 5% m/m em material plástico.

Fonte: ANVISA nº 17 de 17 de março de 2008

### 3.4.2. Bisfenol A

Desde a Resolução RDC 17, de 17 de março de 2008 até a Resolução RDC nº 56, de 16 de novembro de 2012 (em vigor até os dias de hoje) o limite de migração específica permitido é 0,6 mg/Kg de matéria para bisfenol A em materiais plásticos destinados à elaboração de embalagens plásticas e equipamentos em contato com alimentos.

A proibição da fabricação e importação de mamadeiras destinadas a alimentação de lactentes com bisfenol A em sua composição veio através da Resolução da ANVISA RDC nº 41, de 16 de setembro de 2011. Esta Resolução foi revogada pela RDC nº 56, que proibiu outros monômeros além do bisfenol A, bem como a proibição da utilização desses compostos como substâncias ou componentes de preparações na fabricação de mamadeiras e artigos similares destinados a alimentação de lactentes.

## 3.5. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE FTALATOS E BISFENOL A

As técnicas analíticas mais comuns para analisar ftalatos e bisfenol A são as cromatográficas, mas encontra-se também na literatura, análises de bisfenol A por espectrofluorimetria (GALLIMBERTI, 2018; NASCIMENTO, 2018; QUEIROZ, 2012).

### 3.4.1. Técnicas Cromatográficas

A cromatografia líquida é a técnica mais utilizada para analisar o bisfenol A (Tabela 4), visto que é um composto pouco volátil e pode ser detectado por fluorescência através da Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) (ARCE, 2017; BOMFIM, 2015; LOPES, 2016).

Para a cromatografia líquida, os equipamentos mais comuns são o HPLC e a Cromatografia Líquida de Ultra Performance (do inglês, *Ultra Performance Liquid Chromatography*, UPLC), que podem ser acoplados à vários detectores, como o Detector de Arranjo de Diodo (do inglês, *Diode Array Detector*, DAD), o Ultravioleta – Visível (UV-Vis) ou o Detector de Fluorescência (FLD).

Os detectores DAD e UV-Vis baseiam-se na espectrofotometria. No DAD a radiação eletromagnética passa pela amostra e se dispersa com a ajuda de uma grade holográfica

formando uma rede de fotodiodos que é reproduzida em um cromatograma em intervalos de tempo fixos. O UV-Vis é baseado na absorvância da radiação eletromagnética pelo analito ao passar pelo detector, sendo seletivo ao comprimento de onda ajustado. O detector de fluorescência utiliza a excitação de uma lâmpada que é difratada em feixes luminosos que irão excitar a amostra. Esta emite então um feixe ao retornar ao estado fundamental que é incidido no fotodetector.

O HPLC acoplado ao UV-Vis é o mais utilizado (Tabela 4), detectando moléculas cromóforas pela diferença de absorvância na região do ultravioleta ou visível de forma seletiva.

**Tabela 4 – Análises por cromatografia líquida citadas na literatura**

Amostra	Analito	Detector	LD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Referência
Fórmulas infantis em pó	BPA	HPLC-FLD	----	Bomfim et al., 2015
Águas	BPA	HPLC-FLD	3,0	Lopes, 2016
Águas	BPA	HPLC-UV	7,5	Paula, 2014
Águas	BPA	HPLC-UV-vis	100	Teleginski, 2016
Simulantes A, B, C e D	BPA	HPLC-DAD	4,8 - 14,7	Linhares Júnior, 2012
Mamadeiras	BBP, DEP e DEHP	HPLC-UV-Vis	0,27	Sá, 2013
Garrafas de água				
Garrafas PET	DMP, DEP e DBP	HPLC-UV-Vis	0,7 - 2,4	Beltrán et al., 2017
Brinquedos e garrafas de água	BPA	UPLC-UV	0,4	Altannak; Alsaleh, 2015
Brinquedos	BPA	HPLC-FLD	50,0	Arce et al., 2017

**BPA: bisfenol A**

**Fonte: Autor**

Como observado na Tabela 4, de modo geral os trabalhos apresentam bons limites de detecção (LD), entretanto esses limites não dependem somente do detector escolhido, visto que o modo de extração do analito da matriz pode interferir no limite de detecção. Os trabalhos de Teleginski (2016) e Arce (2017) possuem um LD maior que os demais, mesmo assim estão adequados às necessidades da legislação brasileira vigente, que exige como limite  $0,6 \text{ mg L}^{-1}$  de bisfenol A.

A cromatografia gasosa (do inglês, *Gas Chromatography*, GC) é mais utilizada para determinar ftalatos, devido a sua volatilidade (Tabela 5). Para a cromatografia gasosa existem como possíveis detectores: o detector por espectrometria massas (MS), o detector de ionização

por chamas (FID) e o detector por captura de elétrons (do inglês, *Electron Capture Detector*, ECD), sendo o MS o mais utilizado (Tabela 5).

O GC-MS é uma ótima combinação, pois permite ter informações sobre a estrutura dos compostos analisados através da composição da massa molar, desta forma apresenta uma boa seletividade dos compostos analisados com resultados da composição quantitativa e qualitativa de misturas complexas. O FID é um detector mais simples que possui uma sensibilidade menor dentre esses apresentados. O ECD embora apresente ótima sensibilidade para analisar ftalatos, é o menos utilizado por ter desvantagens na quantificação dos compostos. O ECD apresenta uma resposta diferente para cada componente da mesma função química, exigindo assim, uma curva analítica individual na mesma faixa de trabalho.

**Tabela 5 – Análise por cromatografia gasosa utilizada por alguns autores**

Amostra	Analito	Detector	LD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Referência
Alimentos	DEP, BBP, DEHP, DOP, DCHP, DIBP e DBP	MS	0,02 - 0,18	Moreira, 2014
Vegetais	DBP e BBP	GCxGC - FID	0,07 - 0,26	
Urina	BPA	MS	0,8	Özer; Güçer, 2011
Brinquedos	DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP e DNOP	MS	1,3 - 5,1	
Iogurte	DBP, DEHP, DMP, DEP, DNOP e BBP	MS	0,26 - 1,00	
Padrão	DMP, DAP, DEP, DBP, BBP e DEHP	MS	2,0 - 15,0	Lee et al., 2018
Água	DEP, DIBP, DBP, BBP, e DEHP	ECD	0,040 - 0,193	Eskandarpour; Sereshti, 2017
Óleo vegetal e refrigerante	DMP, DEP, DNBP e DEHP	FID	0,1 - 3,3	Uansiri; Vichapong; Kanchanamayoon, 2017
Óleo vegetal e Água	DNPP, DBP e DEHP	FID	0,06 - 0,08	Amanzadeh et al., 2016
Água	BPA	MS	0,001	Martínez et al., 2013
Saliva	BPA	MS	3,5	Montagner, 2013
Urina	BPA	MS	50	Brigante, 2015

**BPA: bisfenol A**

**Fonte: Autor.**

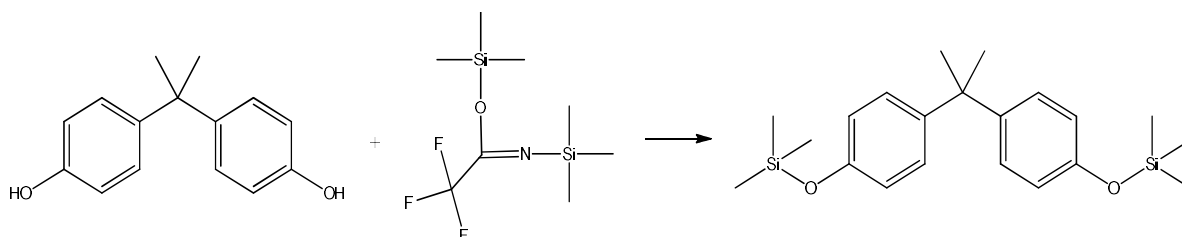
Na Tabela 5 pode-se observar alguns trabalhos realizados com GC tanto para bisfenol A quanto para ftalatos, em que foram utilizados diferentes tipos de detectores. Da mesma forma que as pesquisas apresentadas para cromatografia líquida, as pesquisas para cromatografia

gasosa, com exceção do trabalho mostrado por Brigante (2015), apresentaram bons LDs que dependem tanto dos detectores quanto da forma de extração do analito.

Como pode ser visto, Moreira (2014) utilizou o FID de uma forma diferente com bons LDs. A cromatografia bidimensional abrangente (GCxGC-FID) acopla duas colunas cromatográficas ortogonais, ligando uma a outra, e altera os parâmetros entre elas, obtendo uma melhor separação dos analitos, melhorando a sensibilidade de detecção do FID.

Eventualmente, faz-se necessária a derivatização que funciona como uma etapa extra anterior à cromatografia gasosa, com o objetivo de gerar derivados dos analitos mais voláteis. Este pré-tratamento tem sido aplicado com sucesso na derivatização de bisfenol A e monoésteres, utilizando Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) com 1 % clorotrimetilsilano (TMCS) (BIGRANTE, 2015; KIM, 2014; LIMAM, 2010; MOREIRA, 2015; RASTKARI; AHMADKHANIHA, 2013; SONG, 2013). A figura 10 mostra essa reação de derivatização.

**Figura 10 - Reação de derivatização do BPA com BSTFA**



Fonte: Autor.

Existem outras formas de derivatização, como a mostrada por Viñas (2012), em que é realizada uma acetilação utilizando o anidro acético em meio básico, que se mostrou um método simples e rápido.

No estudo feito por Azzaoui (2013), a extração utilizando derivatização com BSTFA e TMCS seguida de *headspace* (HS) com microextração em fase sólida (SPME) foi comparada à extração sem derivatização. Foi encontrada uma precisão de 9,0% para extração com derivatização e de 5,2% para extração sem derivatização. O HS-SPME que usou a derivatização apresentou limite de detecção em uma ordem de grandeza melhor do que aquele alcançado sem derivatização. Portanto, os extratos normalmente são analisados diretamente por GC-MS com derivatização, pois aumenta a precisão e a sensibilidade. A derivatização é opcional para análise qualitativa usando GC (CAO, 2012).

Para as análises de ftalatos, foi estabelecido pela ABNT um procedimento oficial de determinação de plastificante, este método utiliza cromatografia gasosa acoplada a MS e FID com dois métodos de extração que serão mostrados a seguir. Para o bisfenol A, a ANVISA indica que as análises devem ser realizadas por migração com simulantes, utilizando a cromatografia líquida acoplada a um detector UV, através do método descrito nas normas EN Serie 13130. Entretanto, a ANVISA deixa a opção de utilizar outros métodos que sejam tão sensíveis quanto o indicado, como espectrometria de absorção ou emissão e cromatografia gasosa (INMETRO, 2007).

O método de extração depende da matriz a ser analisada, como foi mostrado nas Tabelas 4 e 5, existem várias matrizes e para cada matriz vários métodos de extração, que serão discutidos a seguir.

#### **3.4.2. Métodos de Extração de Ftalatos e Bisfenol A**

Os ftalatos e o bisfenol A podem ser analisados em várias matrizes, como em água, alimentos, embalagens, brinquedos, etc. Para cada uma dessas matrizes pode-se utilizar diferentes modos de extração do analito. Dentre esses modos de extração destacam-se a extração em fase sólida (SPE), a microextração em fase sólida (SPME), a extração líquido-líquido (LLE), a microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME), o *headspace* com microextração em fase sólida (HS-SPME), dessorção térmica e a dissolução para amostras sólidas. Na dissolução podemos aplicar também funções de apoio para melhorar a extração, tais como radiação micro-ondas, ondas de ultrassom e fluidos supercríticos ou equipamentos como o Soxhlet, para a LLE.

A SPE é mais usada para separação de amostras líquidas, entretanto pode ser usada para amostras sólidas, que seriam pré-dissolvidas em solventes adequados. A SPE tem a vantagem de concentrar as amostras e de “limpar” a mistura. É uma técnica de separação adequada em comparação com a LLE, visto que não necessita de muitas vidrarias específicas, nem de muitos solventes, além disso, requer um tempo de laboratório menor. Apesar de possuir vários tipos de fase sólida para a eluição, tais como o Cucurbit[n]uril (LV, 2017) e o poly(-EGDMA-MATrp) (OSMAN, 2013), a maioria dos trabalhos usam o cartucho C18.

Sendo um método mais sofisticado que o SPE, o SPME é uma técnica de pré-concentração simples que não usa solvente, com alta sensibilidade e que pode ser portátil. São fibras de sílica fundida revestidas de filmes de polímeros sorventes, que podem ser de poliacrilato (MOREIRA,

2014; AZZAOU, 2013), grafeno/cloreto de polivinil (AMANZADEH, 2016). Porém o filme mais utilizado é o Polidimeilsiloxano e suas variações, como o Polidimeilsiloxano/Divinilbenzeno (UANSIRI, 2017; MARTÍNEZ, 2013).

O SPME pode ser usado no GC e HPLC, sendo de forma direta ou indireta. Na forma direta, tem-se o HS-SPME-GC onde o SPME é introduzido em um frasco com a amostra e absorve a amostra por *headspace*, com posterior injeção direta no GC onde ocorrerá a dessorção dentro do injetor do equipamento. O SPME apresenta dificuldades em separar matrizes complexas, pois pode extrair outros compostos não voláteis por estar submerso na solução. Enquanto o HS-SPME apresenta a vantagem da seletividade para compostos voláteis, como os ftalatos, pois a fibra fica suspensa acima da solução eliminando a coextração de produtos indesejados.

O LLE é uma extração de compostos que se baseia na partição de substâncias entre o solvente extrator e a amostra. As vantagens deste método em comparação com os outros são a sua simplicidade, precisão, baixo LD e alta recuperação, entretanto existem alguns métodos de LLE bem dispendiosos, como a extração por Soxhlet. Tem como desvantagem o alto consumo de reagentes e o uso de solventes orgânicos tóxicos para o meio ambiente e para o manipulador. Este método fornece resultados precisos e confiáveis, sendo aplicado à determinação de ftalatos em diferentes matrizes utilizando, essencialmente, acetonitrila ou hexano como solvente de extração. Algumas pesquisas empregam acetato de etila ou diclorometano ou cloreto de metil-éter de petróleo (RUSSO, 2015).

A microextração líquido-líquido (LLME) é um método com melhor sensibilidade que o LLE. A LLME possui variações como a microextração com gota solidificada ou suspensa, a microextração em fase líquida, a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME), etc. (NASCIMENTO, 2018).

A DLLME é o mais utilizado, tendo como vantagem sua simplicidade, rapidez, baixo custo, alta recuperação, fatores de enriquecimento, mínima quantidade de solventes orgânicos, e conseqüentemente, baixa geração de resíduos. O método consiste na mistura apropriada de solvente de extração e solvente dispersivo, que são injetados rapidamente em uma amostra aquosa por meio de uma seringa para formar uma solução turva, que devido a dispersão de pequenas gotículas, aumenta a superfície de contato entre as fases e favorece a extração do analito. O método é baseado na adição de um solvente imiscível com maior densidade (solventes clorados) em amostras aquosas para etapa de extração.

A dessorção térmica é uma tecnologia que utiliza calor para aumentar a volatilidade de contaminantes, de forma que eles possam ser removidos das matrizes líquidas ou sólidas. Os

contaminantes volatilizados são então coletados ou destruídos termicamente, em seguida, os compostos são aquecidos em um fluxo de gás e liberados para serem analisados no GC (RUSSO, 2015). Esse método melhora a separação e definição dos os picos cromatográficos e o limite de detecção. O HS é um tipo de dessorção térmica, onde o composto volátil é coletado por aquecimento da amostra; a SPME é uma dessorção que utiliza fibras para coletar amostras e realizar a dessorção direta no GC.

A dissolução direta de matrizes sólidas é um outro método de extração, que pode ser seguida ou não de uma LLE. Têm-se métodos de dissolução em THF (ABNT, 2018), em clorofórmio (ÖZER, 2011), entre outros. Esse processo de dissolução pode ser combinado com outros processos, como ultrassom (ÖZER, 2011; VIÑAS, 2012; AL-NATSHEH, 2015), micro-ondas (CACHO, 2016), etc.

Na tabela 6 pode-se observar algumas relações entre o método de extração e o tipo de detector utilizado e como eles interferem no LD do método.

**Tabela 6 – Relação entre método de extração e detector utilizado**

Amostras	Analito	Tipo de Extração	Detector	LD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Referência
Águas	BPA	DLLME	Espectrofluorímetro	1,8	Nascimento, 2018
Saliva	BPA	LLE	GC-MS	3,5	Montagner, 2013
Águas	BPA	SPE	HPLC-UV	7,5	Paula, 2014
Urina	BPA	SPME	GC-MS	0,8	Moreira, 2014
Água	BPA	HS-SPME	GC-MS	0,001	Martínez et al., 2013
Óleo vegetal e Água	DNPP, DBP e DEHP	HS-SPME	GC-FID	0,06 - 0,08	Amanzadeh et al., 2016
Água	DEP, DIBP, DBP, BBP, e DEHP	HS-SPME	GC-ECD	0,040 - 0,193	Eskandarpou; Sereshti, 2017
Brinquedos	DIBP, DBP, DPP, BBP, DEHP e DNOP	SPE	GC-MS	2,5 - 12,5	Lv et al., 2017
Iogurte	DBP, DEHP, DMP, DEP, DNOP e BBP	SPE	GC-MS	0,26 - 1,00	Sireli et al., 2017
Brinquedos	BBP, DBP, DNOP, DEHP, DIDP e DINP	LLE	UPLC-MS	0,32 - 1,66	Chen; Zhang, 2013
Recipientes plásticos	DBP, BBP	Micro-ondas / SPME	GC-MS	0,08 - 0,31	
Alimentos	DEP, BBP, DEHP, DOP, DCHP, DIBP e DBP	Chapa aquecedora / SPME	GC-MS	0,02 - 0,18	Moreira, 2014

Fonte: Autor.



Na análise de bisfenol A, Nascimento (2018) e Montagner (2013) utilizaram DLLME e LLE, respectivamente, e pode-se observar um LD menor para o trabalho de Nascimento (2018), mesmo tendo um equipamento acoplado a um detector menos robusto que o GC-MS. Isso se deve a uma melhor pré-concentração do analito ao utilizar o DLLME.

Situação semelhante pode ser observada nos trabalhos que utilizam os métodos de extração SPE, SPME e HS-SPME para o mesmo analito, onde o LD torna-se melhor à medida que se utiliza um método de extração mais sofisticado em fase sólida. Para as análises utilizando HS-SPME, Amanzadeh (2016) usou um detector do tipo FID tendo um ótimo LD devido a pré-concentração provinda do HS-SPME. Mesmo para analitos diferentes, podemos observar bons LDs provindos da maior sensibilidade com os detectores de ECD e MS dos trabalhos de Martínez (2013) e Eskandarpour (2017), respectivamente.

Apesar de não possuírem matrizes semelhantes, podemos observar em Lv e colaboradores (2017) e Sireli e colaboradores (2017), que o mesmo método de extração pode apresentar diferentes LDs. Isso ocorre porque para os diferentes métodos de extração tem-se diferentes materiais extratores que iram interagir de forma específica com as matrizes. No trabalho de Lv (2017) é usado como composto absorvente o Cucurbit[n]uril e o trabalho apresentado por Sireli (2017) utiliza o cartucho C18. A maior sensibilidade na extração se deve a uma maior afinidade, entre o analito em questão e o composto absorvente ou extrator, o que pode ser observado também em LLE (CHEN, 2013).

Moreira (2014) utilizou dois métodos auxiliares diferentes para a SPME. Em ambos, a extração do analito da amostra foi realizada via migração, na qual a amostra foi exposta a um simulante e, posteriormente, extraída por SPME. Contudo, é possível observar uma pequena variação nos LDs mostrando a importância desses métodos auxiliares, principalmente nos ensaios com migração.

Outro ponto a ser observado na tabela 6 é a variação das matrizes, por isso, o método de extração, o tipo de detector, o equipamento e a realização ou não de um teste de migração, fazem grande diferença no resultado que será obtido.

### **3.4.3. Análises de Migração de Ftalatos e Bisfenol A**

Diversas pesquisas discutem a migração de ftalatos, visto que esta causa inúmeros problemas relacionados a esses contaminantes, tais como, contaminação do meio ambiente, de alimentos, de água mineral, de recipientes plásticos, de mamadeiras, de brinquedos, etc. Como

boa parte dos desreguladores endócrinos que chegam ao organismo humano são provenientes de embalagens plásticas que acondicionam alimentos, muitos estudos de migração foram realizados com a finalidade de determinar a exposição desses contaminantes para o consumo humano. Nessas pesquisas, é de grande importância a avaliação do simulante que será utilizado para a migração, que deve ter características semelhantes ao produto exposto, ou seja, soluções que imitam o comportamento de um grupo de alimento.

Como comentado anteriormente, a ANVISA através da RDC nº 51 de 26 de novembro de 2010, regulamenta os ensaios de migração envolvendo materiais plásticos usados para acondicionar alimentos ou bebidas. A ANVISA estipula que os alimentos ou bebidas devem ser classificados da seguinte forma: aquosos não ácidos ( $\text{pH} > 4,5$ ), aquosos ácidos ( $\text{pH} < 4,5$ ), gordurosos (que contenham gordura ou óleos entre seus componentes), alcoólicos (conteúdo de álcool  $> 5\%$  (v/v)) e secos.

A ANVISA (2010) atribuiu os seguintes simulantes para ensaios de migração: Simulante A (simulante de alimentos aquosos não ácidos ( $\text{pH} > 4,5$ )): água destilada ou desionizada; Simulante B (simulante de alimentos aquosos ácidos ( $\text{pH} < 4,5$ )): solução de ácido acético a 3% (m/v) em água destilada ou desionizada; Simulante C (simulante de alimentos alcoólicos): solução de etanol a 10% (v/v) em água destilada ou desionizada, concentração que se ajustará ao conteúdo real de etanol do produto no caso desse superar os 10% (v/v); Simulante D (simulante de alimentos gordurosos): solução de etanol a 95% (v/v) em água destilada ou desionizada, ou isooctano, ou MPPO (óxido de polifenileno modificado), conforme o caso; Simulante D' (simulante equivalente ao simulante D): azeites/ óleos comestíveis (azeite de oliva, óleo de girassol, óleo de milho) ou misturas sintéticas de triglicerídios.

As condições de temperatura e tempo de contato com os simulantes depende, de uma forma geral, das instruções de uso das embalagens, sendo usada a condição mais crítica de temperatura e tempo de exposição. Entretanto, quando essas instruções de uso não estiverem estabelecidas na embalagem, o ensaio de migração será realizado durante 4 horas a 100 °C (ou a temperatura de refluxo) com os simulantes A, B ou C, e durante 2 horas a 175 °C com o simulante D', ou nas condições equivalentes para o simulante D (ANVISA, 2010). A RDC nº 51 da ANVISA mostra de forma detalhada, várias temperaturas e tempos de contato para se trabalhar com esses simulantes das mais variadas formas, podendo aumentar ou diminuir esses parâmetros de acordo com as condições do alimento, características da embalagem e necessidade do analista.

Em pesquisas realizadas em brinquedos e utensílios para lactentes, foram usadas as salivas artificiais (VIÑA, 2012; ÖZER 2011; OSMAN, 2013; LV, 2017) afim de avaliar a possível

contaminação das crianças expostas por contato oral. A maioria desses estudos usa a composição de  $0,17 \text{ g L}^{-1}$  de cloreto de magnésio,  $0,11 \text{ g L}^{-1}$  de cloreto de cálcio,  $0,57 \text{ g L}^{-1}$  de hidrogenofosfato de dipotássio,  $0,53 \text{ g L}^{-1}$  de carbonato de potássio,  $0,33 \text{ g L}^{-1}$  de cloreto de sódio e  $0,75 \text{ g L}^{-1}$  de cloreto de potássio (AL-NATSHEH, 2015), tendo pequenas divergências quanto a concentração desses sais, que são ajustados à pH 6,8 com ácido clorídrico  $3 \text{ mol L}^{-1}$ . O procedimento utilizando saliva artificial, de um modo geral, é realizado com a imersão do analito em um certo volume da saliva, que irá variar de acordo com o tamanho do analito, podendo ser previamente cortado em pedaços de 1 mm a 3 cm (VIÑA, 2012). O material em estudo passa por uma extração com agitação e é mantido a temperaturas em torno de  $37^{\circ}\text{C}$  por um período entre 30 e 60 minutos.

No trabalho de Lv (2017) foi utilizada saliva com composição diferente, tendo  $4,5 \text{ g L}^{-1}$  de cloreto de sódio,  $0,3 \text{ g L}^{-1}$  de cloreto de potássio,  $0,3 \text{ g L}^{-1}$  de sulfato de sódio,  $0,4 \text{ g L}^{-1}$  de cloreto de amônio,  $0,3 \text{ g L}^{-1}$  de ácido láctico 90% e  $0,2 \text{ g L}^{-1}$  de ureia, referenciada no padrão DIN53160 dos EUA de 2010. Além dessas salivas artificiais que foram preparadas pelos próprios autores durante a realização da pesquisa, existem também salivas que são comercializadas, que tem características diferentes para usos específicos, como tratamento de doenças (CABRAL, 2012).

#### **3.4.4. Determinação de Ftalatos e Bisfenol A em Brinquedos e Utensílios para Lactentes**

O bisfenol A, como visto anteriormente, é utilizado para fazer resinas epóxi e policarbonatos, que são aplicados nos mais diversos tipos de produtos, incluindo os artigos infantis. Pesquisas foram realizadas com o intuito de elaborar metodologias analíticas para determinação do bisfenol A nos produtos infantis, com o intuito de avaliar o nível de exposição das crianças considerando a legislação vigente.

Na tabela 7 observa-se alguns estudos em brinquedos e utensílios para bebês, nos quais foi verificada a bioacessibilidade do bisfenol A em condições brandas e a decomposição dos produtos utilizados pelos lactentes.

**Tabela 7 – Trabalhos envolvendo bioacessibilidade de bisfenol A em brinquedos e utensílios para bebês**

Amostras	Tipo de extração	Detector	LD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Referência
Brinquedos	Imersão em água à 40°C por 24 horas e saliva artificial à 37°C por 2 horas	HPLC-FLD	50,0	Arce et al., 2017
Brinquedos	Imersão em água 40°C por 4 dias	UPLC-UV	0,4	Altannak; Alsaleh, 2015
Brinquedos e utensílios de bebês	Imersão em saliva artificial por 1 minuto	GC-MS	0,01	Viñas et al., 2012
<b>Fonte: Autor</b>				

Podemos observar na tabela 7 que somente três estudos foram encontrados para determinação de bisfenol A em artigos infantis, isso porque esses utensílios são fabricados em policarbonato e resinas epóxi, o que faz com que somente a análise de migração por decomposição seja válida. A determinação de bisfenol A ocorre em análises de águas, urina, alimentos, saliva e até em simulantes como pode ser observado nas tabelas 4, 5, e 6.

Novamente, a cromatografia líquida apresenta mais uso nas análises de bisfenol A devido a sua baixa volatilidade, conforme observado nos trabalhos de Arce (2017) e Altannak (2015). Entretanto, pode ser analisado por cromatografia gasosa como visto em Viñas (2012). É importante ressaltar que em Viñas (2012) a preparação da amostra foi realizada por derivatização.

Como visto anteriormente, os ftalatos possuem uma alta toxicidade e a exposição a vários ftalatos leva ao acúmulo dos seus efeitos, desta forma, é de grande importância sua quantificação para fiscalização pelos órgãos competentes, assim como a pesquisa de novos métodos de análise. Pode ser realizada a determinação direta da concentração do ftalato adicionado no material plástico e daqueles que migram do material para o meio externo através dos mecanismos citados anteriormente. Tanto a concentração dos ftalatos no produto final, quando a concentração de migração (determinada em massa de ftalato por massa do material) seguem a legislação brasileira vigente que foi descrita no capítulo 3.

Como pode ser observado na Tabela 8 a maior parte das pesquisas realizadas utilizaram a cromatografia gasosa, entretanto como mostrado por Sá (2013) também é possível utilizar a cromatografia líquida com mesma sensibilidade de detecção. É importante observar que o método da ABNT (2018) usa o GC-MS/FID com extração LLE ou Soxhlet apenas para determinação.

**Tabela 8 - Trabalhos envolvendo determinação e bioacessibilidade de ftalatos em brinquedos e utensílios para bebês**

Amostras	Tipo de ftalatos	Método	Tipo de extração	Detector	LD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Referência
Brinquedos	DBP, BBP, DEHP, DNOP, DINP e DIDP	Determinação	SPME	MS	-	Yuzawa et al., 2009
Brinquedos	BBP, DBP, DNOP, DEHP, DIDP e DINP		LLE	MS	0,32 - 1,66	Chen; Zhabg, 2013
Brinquedos	DBP, BBP, DEHP, DNOP, DINP e DIDP		Soxhlet	MS ou FID	-	ABNT 2018
			LLE / THF			
Brinquedos	DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP e DnOP	Bioacessibilidade	LLE / Ultrassom	MS	1,3 - 5,1	Özer; Güçer, 2011
			Imersão em saliva artificial a 30°C			
Mamadeiras	BBP, DEP e DEHP		Banho maria com água a 80°C / SPE	HPLC - UV-Vis	0,27	Sá, 2013
Mamadeiras	DEHP e DBP		Imersão em simulantes 70°C / LLE	MS	10 - 16	Oliveira, 2013
Brinquedos	DIBP, DBP, DPP, BBP, DEHP e DNOP		Saliva artificial / SPE	MS	2,5 - 12,5	Lv et al., 2017
Brinquedos e utensílios de bebês	DIBP, DBP, DMEP, BBP, DEHP e DNOP	Água / LLE	MS	0,1 - 0,37	Al-Natsheh et al., 2015	
		Saliva artificial / LLE				

Fonte: Autor.

Na determinação são utilizadas técnicas de extração para separar os ftalatos da matriz que geralmente envolvem a dissolução do material. Já nos testes de bioacessibilidade, a matriz deve permanecer intacta, desta forma o material é imerso em água ou soluções que irão alojar esses ftalatos que migraram para fora do material que, posteriormente, serão, em muitos casos, separados dessa solução extratora e analisados quantitativamente.

Nos estudos realizados em garrafas e embalagens, grande parte dos testes de migração são realizados com água (AL-NATSHEH, 2015; BELTRÁN, 2017; MOREIRA, 2014; SÁ, 2013). A legislação brasileira indica a utilização dos simulantes para prover maior semelhança no contato entre a embalagem e o produto. Contudo, alguns autores realizaram trabalhos em brinquedos e utensílios para bebês utilizando a saliva artificial para verificar a bioacessibilidade dos ftalatos.

### 3.6. VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Os métodos analíticos são utilizados para determinar concentrações e identificar substâncias ou compostos de interesse, entretanto para que os resultados do método proposto sejam confiáveis é necessária a validação do método. Esta tem como objetivo trazer evidências documentais de que o método é adequado ao uso pretendido. Através de testes de parâmetros analíticos, análises estatísticas e de uma avaliação adequada dos dados obtidos no desenvolvimento do método, a validação é feita com confiabilidade (ANVISA nº10/2017). Além da validação de métodos novos temos também a validação parcial, que é aplicada a modificações de metodologia, tais como mudança de matriz ou mudança de equipamentos (SÁ, 2013).

A confiabilidade estatística está ligada diretamente à qualidade das medidas instrumentais, o que indica a importância da avaliação sistêmica dos erros, ou seja, a validação estatística dá suporte às análises químicas realizadas (BAZÍLIO, 2014).

Para a validação do método usado nesta pesquisa foi consultado o *Guia para Tratamento Estatístico de Validação Analítica* da ANVISA (nº10/2017), que cumpre a resolução RDC nº 166/2017. Esta resolução trata da avaliação estatística da linearidade, análise de variância pelo método ANOVA e avaliação estatística pelo efeito matriz. Sendo avaliados também os limites de detecção, limites de quantificação, precisão e exatidão, além dos ensaios de recuperação.

#### 3.6.1. Curva Analítica e Linearidade

A curva analítica é um conjunto de dados analíticos em condições específicas e conhecidas que através da proporcionalidade pode ser usada para quantificar substâncias ou compostos em amostras não conhecidas. Uma curva que possui linearidade expressa os resultados do analito diretamente proporcionais as concentrações usadas na curva analítica. Essas concentrações estão ligadas as respostas do equipamento em questão, como absorvância, áreas de picos, volume de titulante, condutividade, entre outros (ANVISA, Guia nº 10/2017; BAZÍLIO, 2014).

A curva analítica, que se apresenta através da relação matemática entre a resposta dos equipamentos e as concentrações conhecidas, é uma equação da reta, que embora possa ter apenas dois pontos, é comumente feita com cinco pontos para minimizar os possíveis erros associados. Esses pontos são definidos pelas concentrações escolhidas pelo método e estão

ligados diretamente a concentração do analito que se deseja quantificar e aos limites de detecção e quantificação (ANVISA, Guia n° 10/2017; MONTAGNER, 2013).

A curva analítica é expressa pela equação de regressão linear (Eq. 1), onde **a** é a inclinação, **b** é a intersecção ao eixo y, **y** é a resposta do detector, **x** é a concentração do analito e **c** é o erro do modelo (ANVISA, Guia n° 10/2017; GALLIMBERTI, 2018; MONTAGNER, 2013).

$$y = ax + b + c \quad (\text{Eq. 1})$$

O coeficiente de correlação (**r**) permite estimar a qualidade da curva analítica através de uma menor dispersão e incerteza nos coeficientes de regressão. O valor de **r** deve ser o mais próximo de 1, e o seu mínimo sendo 0,990 (ANVISA, Guia n° 10/2017; GALLIMBERTI, 2018; MONTAGNER, 2013).

O método recomendado pela ANVISA (Guia n° 10/2017) para estimar a equação da reta é o dos mínimos quadrados, podendo ou não ter um fator de ponderação, denominados: método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) e método dos mínimos quadrados ponderados (MMQP). A partir da escolha de um desses métodos obtém-se a equação da reta que será usada para calcular os valores da regressão que serão aplicados à ANOVA.

### **3.6.2. Análise de Variância**

A ANOVA permite verificar se a relação entre concentração e o sinal analítico é satisfatória ao avaliar a curva de regressão. Essa avaliação é demonstrada quando a variância devido à regressão do método escolhido é maior que a variância do erro encontrado na análise de resíduos (ANVISA, Guia n° 10/2017).

### **3.6.3. Limite de Detecção e Quantificação**

Ao se trabalhar com medidas analíticas em baixos níveis de concentração dos analitos é importante saber quanto o método proposto pode detectar e quantificar do analito. Para isso utiliza-se como auxílio na validação do método, os limites de detecção e quantificação.

O limite de detecção (LD) é representado pela menor quantidade de analito presente na amostra que pode ser detectado nas condições do método utilizado. Para métodos instrumentais o LD pode ser determinado pela razão sinal-ruído, que deve ser maior ou igual a 2:1, entretanto

o LD também pode ser determinado pela equação 2 com o uso de dados da curva analítica. Na equação, o  $S$  é o desvio padrão do sinal-ruído do branco e  $a$  é a inclinação ou coeficiente angular da curva analítica (ANVISA RDC n° 166/2017).

$$LD = (3,3 \times S) / a \quad (\text{Eq. 2})$$

O limite de quantificação (LQ) é representado pela menor quantidade de analito presente na amostra que pode ser determinado com precisão e exatidão nas condições do método utilizado. Da mesma maneira que o LD, o LQ também se utiliza do sinal-ruído e pode ser determinado pelos dados da curva analítica através da equação 3, em que  $S$  é o desvio padrão do sinal-ruído do branco e  $a$  é a inclinação ou coeficiente angular da curva analítica (ANVISA RDC n° 166/2017).

$$LQ = (10 \times S) / a \quad (\text{Eq. 3})$$

Existem outros meios para se determinar o LD e o LQ, mas devido a confiabilidade estatística da curva analítica essa é uma forma bastante empregada de mensurar esses parâmetros (MONTAGNER, 2013).

#### **3.6.4. Planejamento Fatorial**

No desenvolvimento de um método analítico, muitas variáveis irão interferir positiva ou negativamente no uso do método estudado. Para determinar como usar esses parâmetros da melhor forma faz-se necessário um planejamento experimental.

Uma boa ferramenta é o planejamento fatorial, através dele pode-se extrair informações úteis com poucos experimentos, otimizando a pesquisa (MARINHO, 2005). O planejamento fatorial é realizado antes do procedimento experimental com o intuito de definir as variáveis importantes e os seus efeitos, para dessa forma definir o melhor método a ser usado (GALDÁMEZ, 2002).



### 3.6.5. Precisão e Exatidão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas da mesma amostra que devem ser preparadas de maneira independente desde o início do procedimento em questão. Pode ser expressa por meio da repetibilidade, da precisão intermediária ou da reprodutibilidade, que serão calculadas através do desvio padrão relativo (DPR). Na equação 4, **S** é o desvio padrão e **M** a média das concentrações encontradas (ANVISA RDC n° 166/2017).

$$DPR = \frac{(S \times 100)}{M} \quad (\text{Eq. 4})$$

A precisão será medida através da repetibilidade com amostras de referência utilizadas na curva analítica, sendo e as replicatas serão analisadas em um curto período, com o mesmo analista no mesmo instrumento (GALLIMBERTI, 2018; MONTAGNER, 2013).

Os valores aceitáveis para a precisão serão avaliados pelo valor de HORRAT ( $HO_R$ ), conforme a equação 5, **C** é a concentração da amostra. O método será preciso quando o  $HO_R$  for menor que 2.

$$HO_R = \frac{DPR}{2^{(1-0,5\log C)}} \quad (\text{Eq. 5})$$

A exatidão é determinada pela concordância entre os resultados obtidos pelo método analítico em questão e uma amostra com resultado já determinado como verdadeiro. Da mesma forma que na precisão, os ensaios da exatidão devem ser realizados independentes desde o início (ANVISA RDC n° 166/2017).

Pode-se determinar a exatidão com o uso de material de referência, comparação com métodos conhecidos e ensaios de recuperação e adição padrão, tendo como parâmetro de limite de aceitação a faixa de 70 a 120% (GALLIMBERTI, 2018; SÁ, 2013). Para este trabalho foi utilizado o ensaio de adição e recuperação devido a não apresentar efeito matriz.

### 3.6.6. Efeito Matriz

A seletividade do método analítico mostra a capacidade da quantificação e identificação do analito independentemente de interferentes, como a presença de outras substâncias ou

compostos na matriz. Esta seletividade pode ser testada utilizando o ensaio de efeito matriz, que necessita apresentar resultados de inclinação semelhantes na comparação entre as curvas analíticas (ANVISA RDC n° 166/2017; BAZÍLIO, 2014).

A análise do efeito matriz é realizada construindo uma curva analítica fortificada, onde os padrões da curva principal são adicionados ao analito, gerando assim, uma curva paralela. A avaliação é feita quando a relação entre os coeficientes angulares não for estatisticamente diferente, através do teste t emparelhado (ANVISA RDC n° 166/2017).

### 3.6.7. Ensaio de Recuperação

O ensaio de recuperação está diretamente associado a exatidão do método, uma vez que ele avalia a recuperação da adição de uma quantidade específica da solução de referência sobre a matriz, em adição a concentração extraída da própria matriz (GALLIMBERTI, 2018). É utilizada quando não existe efeito matriz.

Para a recuperação tem-se a equação 6, na qual **C<sub>ad</sub>** é a concentração adicionada da solução de referência, **C<sub>a</sub>** é a concentração da amostra sem adição e **C<sub>t</sub>** é a concentração encontrada após a fortificação, gerando assim a porcentagem da recuperação após a realização do procedimento analítico em teste.

$$\text{Recuperação} = \frac{C_t}{(C_{ad} + C_a)} \times 100 \quad (\text{Eq. 6})$$

## 4. MATERIAIS E MÉTODO

Para o desenvolvimento do trabalho proposto, a água ultrapura foi obtida de um sistema Elga PURELAB Ultra Analytic (Elga, High Wycombe, Bucks, UK) com resistividade de  $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$  e todos reagentes usados foram de grau analítico. Também, foram utilizados vidrarias e materiais de uso comum em laboratórios. Todas as vidrarias foram lavadas previamente do uso afim de evitar a contaminação cruzada entre as amostras. O processo de limpeza teve a seguinte sequência: lavagem com detergente neutro, enxague com água ultrapura e enxague com metanol grau HPLC, posteriormente levadas a estufa à  $105 \text{ }^\circ\text{C}$  para secagem.

### 4.1. SOLUÇÕES ESTOQUE E DE TRABALHO

Para o preparo das soluções de referência, foram utilizados padrões primários, todos adquiridos na Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) com as seguintes purezas: bisfenol A e DIDP (pureza  $> 99\%$ ), DBP (pureza de  $99\%$ ), DEHP (pureza de  $99,7\%$ ) e DNOP (pureza de  $98,8\%$ ).

Como solvente e fase móvel foi utilizado o metanol grau HPLC do fabricante J.T. Baker de  $99,9\%$  de pureza e água ultrapura. Para o preparo das soluções de amostra e otimização do método foram utilizados metanol, diclorometano do (QHEMIS, pureza de  $99,5\%$ ), o clorofórmio (QHEMIS pureza de  $99,8\%$ ) e nitrogênio líquido (White Martins pureza de  $100\%$ ).

### 4.2. SOLUÇÕES DE REFERÊNCIA ESTOQUE E DE TRABALHO

A ANVISA (2017) estabelece que as medidas da validação do método devem ser realizadas em indivíduos independentes, ou seja, diferentes pesagens a partir dos compostos químicos de referência. Contudo, caso seja inviável o preparo independente, podem ser utilizadas diluições separadas a partir de uma solução de referência. Tendo em vista o estabelecido pela ANVISA, foi preparada uma solução de referência a partir dos padrões primários e, em seguida, foram realizadas as diluições necessárias para preparar as soluções de trabalho.

A solução estoque foi preparada pesando-se  $20 \text{ mg}$  do DBP, DEHP, DNOP e bisfenol A e  $200 \text{ mg}$  do DIDP em um béquer. Foi colocado metanol grau HPLC para dissolução e transferiu-se para um balão volumétrico de  $100 \text{ mL}$ . A partir de diluições adequadas, em balões de  $50 \text{ mL}$ ,

da solução estoque foram preparadas as soluções de trabalho nas concentrações estabelecidas. Todas as soluções foram mantidas sob refrigeração, a  $-5^{\circ}\text{C}$ .

Seguindo a mesma faixa de trabalho da ABNT-NBR16040 (2018) que dispõem sobre a análise de ftalatos em brinquedos, foram preparadas soluções de referência de ftalatos DBP, DEHP e DNOP nas concentrações (em  $\text{mg L}^{-1}$ ) de 0,5; 1; 2; 5 e 10 e para o DIDP nas concentrações (em  $\text{mg L}^{-1}$ ) de 5; 10; 20; 50 e 100.

Para estabelecer a faixa de concentração do bisfenol A, baseou-se na resolução RDC nº 56 (2012) que permite até  $0,6 \text{ mg L}^{-1}$  do analito em utensílios para lactentes para ensaios de migração, sendo realizada a curva analítica nas concentrações (em  $\text{mg L}^{-1}$ ) de 0,5; 1; 2, 5 e 10.

Todos as diluições foram realizadas com metanol grau HPLC.

### 4.3. EQUIPAMENTOS

As pesagens dos reagentes e das amostras foram realizadas em balança analítica (Mettler Toledo, modelo Excellence Plus XP205, com 5 casas decimais).

Para o preparo das amostras foram utilizados moinho criogênico (Retsch, modelo ZM 200 com peneira de  $500 \mu\text{m}$ ), banho ultrassom (Branson, modelo 5510), estufa (Thermo Scientific, modelo Thermo electron Led GmbH), chapa aquecedora (Magnetic e Motion, modelo 2MAG) e rotoevaporador (Fisatom, modelo 102E).

As análises foram realizadas no cromatógrafo líquido de alta eficiência (Agilent Technologies, modelo 1260 Infinity), operando com um sistema de bombeamento quaternário de solventes do tipo G1311B, que possui um degaseificador integrado à bomba, válvula de injeção de amostra Rheodyne 7725i, compartimento de coluna termostabilizado G1316A, detector UV-Vis G1365C MWD, sendo este módulo a comunicação entre o HPLC e o computador utilizando a conexão de rede CAN. A coluna cromatográfica utilizada foi a ZORBAX Eclipse Plus C18 da (Agilent), com 250 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e fase estacionária de  $5 \mu\text{m}$ , tamanho de partícula  $5 \mu\text{m}$ , diâmetro de poro de  $95 \text{ \AA}$ , capeamento duplo e fase reversa.

### 4.4. AMOSTRAS

Foram adquiridas dez amostras de utensílios para lactentes no comércio local da cidade do Recife-PE, Brasil, em setembro de 2019. Cinco amostras não apresentavam informações acerca

do uso de ftalatos e bisfenol A em sua embalagem e as outras cinco amostras informavam que não possuíam bisfenol A ou ftalatos.

#### 4.4.1. Pré-tratamento das Amostras

Antes do uso nas análises, as amostras foram cortadas em pedaços de aproximadamente 2 cm<sup>3</sup> com o auxílio do alicate de corte, posteriormente foram imersas no nitrogênio líquido para serem trituradas no moinho criogênico. As amostras foram armazenadas em recipientes de vidro para uso posterior.

#### 4.4.2. Planejamento Fatorial para o Preparo das Amostras

O planejamento fatorial completo foi utilizado para realizar a otimização das variáveis envolvidas na etapa de extração, que foram: tempo de banho, temperatura do banho, massa da amostra e volume de solução que será utilizado. A otimização e processamento dos dados do planejamento foi realizada utilizando o software Design Expert 7.0.0 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN, USA).

Na otimização da extração foram definidas quatro variáveis (fatores), onde foi aplicado um planejamento fatorial completo do tipo 2<sup>4</sup>, com mais cinco repetições do ponto central, gerando um total de 21 experimentos. Os níveis dos fatores foram retirados de valores encontrada na literatura. Desta forma, obteve-se os seguintes fatores e valores:

**Tabela 9 – Fatores e valores do planejamento fatorial completo 2<sup>4</sup> para otimização da extração de bisfenol A e ftalatos em amostras de utensílios para lactentes**

Fator	-1	Médio	+1
(A): Tempo de ultrassom em minutos	20	40	60
(B): Temperatura em °C	25	45	65
(C): Volume em mL	2	6	10
(D): Massa em g	0,5	1,0	1,5

Fonte: Autor

Ao inserir os fatores no *software* foi gerada a matriz de planejamento, que mostrava as condições experimentais de cada variável para cada teste. É importante salientar que todos os

testes foram realizados com a mesma amostra para verificar a melhor extração diante da modificação desses fatores. Como parâmetro de resposta a otimização dos fatores, foram utilizadas as áreas dos picos dos compostos estudados neste trabalho, que foram oriundos das injeções no HPLC de cada amostra.

#### 4.5. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

As condições cromatográficas para o desenvolvimento do método proposto foram: comprimento de onda de 230 nm, volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ , fluxo de 1,0  $\text{mL min}^{-1}$ , temperatura da coluna em 40  $^{\circ}\text{C}$  e 20 minutos de tempo de corrida. Para obtenção dos sinais (picos) com definição adequada, inicialmente, fez-se a eluição com fase móvel gradiente com início na proporção 70:30 % metanol:água, e, posterior, aumento da fase orgânica para 97%.

Após selecionada a proporção metanol:água, a corrida foi realizada no modo gradiente, da seguinte forma:

- Início com eluição 70:30 de metanol/água até os 3 minutos.
- Aumento da fase orgânica de forma gradativa até 97:3 durante 2 minutos.
- Mantida a proporção de 97:3 por 12 minutos.
- Retorno para a fase móvel em 70:30 para condicionar o início da próxima corrida.

Para a avaliação da qualidade dos picos cromatográficos foi utilizada o cálculo da resolução ( $R_S$ ) que mostra a capacidade da coluna em separa os picos de interesse adequadamente. A resolução leva em consideração a eficiência da coluna, a seletividade e a retenção. O valor de 1,6 garante resultados qualitativos mais precisos, valores maior ou igual a 1,7 podem ser utilizados em métodos mais robustos, o valor de 0,6 é o mínimo necessário diferenciar o vale entre picos de mesma altura. A  $R_S$  é expressa pela equação 7,  $t_1$  e  $t_2$  são os tempos de retenção dos picos a serem comparados e  $W_1$  e  $W_2$  são as larguras das bases dos picos avaliados.

$$R_S = \frac{2(t_2 - t_1)}{(W_1 + W_2)} \quad (\text{Eq. 7})$$

#### 4.6. VALIDAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO

Para a validação do método proposto seguiu-se o *Guia para Tratamento Estatístico de Validação Analítica* (ANVISA, nº10/2017) que trata do efeito matriz a partir da adição de padrão. Também foi realizado teste de recuperação e a avaliação da precisão.

Antes da validação, foi realizado um planejamento fatorial com o intuito de determinar os melhores valores numéricos dos fatores envolvidos no preparo das amostras.

#### 4.7. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO NAS AMOSTRAS

Após a escolha dos parâmetros através do planejamento fatorial as amostras seguiram os seguintes passos na determinação da concentração dos analitos: Cada amostra foi pesada 1,50 g utilizando um frasco de vidro, posteriormente, adicionou-se 10 mL de clorofórmio e levou-se ao banho de ultrassom. No banho, as amostras foram submetidas a 20 minutos de sonificação à 65°C. Posteriormente, foram rotoevaporadas à 50°C. Os frascos foram lavados com 2 mL de metanol grau HPLC, para injeção no cromatógrafo.

#### 4.8. AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO

A saliva artificial foi preparada misturando em água: 0,17g de cloreto de magnésio, 0,11g de cloreto de cálcio, 0,33g de cloreto de sódio, 0,75g de cloreto de potássio, 0,57 g de hidrogenofosfato de dipotássio e 0,53g de carbonato de potássio. O pH foi ajustado para 6,8 com ácido clorídrico a 3 mol L<sup>-1</sup>.

Para realizar a extração, as amostras foram cortadas em dois pedaços de 1 mm de espessura, 1 cm de altura e 2,5 cm de comprimento, totalizando a área de 2,5 cm<sup>2</sup>. Cada pedaço foi pesado e então colocado em um frasco de vidro, sendo adicionado 12,5 mL da saliva artificial. Cada frasco foi levado à chapa aquecedora com agitação por 30 minutos, à 37°C. Depois as salivas de cada frasco foram levadas à um mesmo funil de separação, onde foram adicionados 5 mL de clorofórmio para a extração dos compostos para a fase orgânica.

Após a realização da LLE, o clorofórmio foi rotoevaporado à 50°C e o frasco foi lavado com 2 mL de metanol grau HPLC. Este metanol foi, posteriormente, injetado no cromatógrafo para a obtenção das concentrações.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

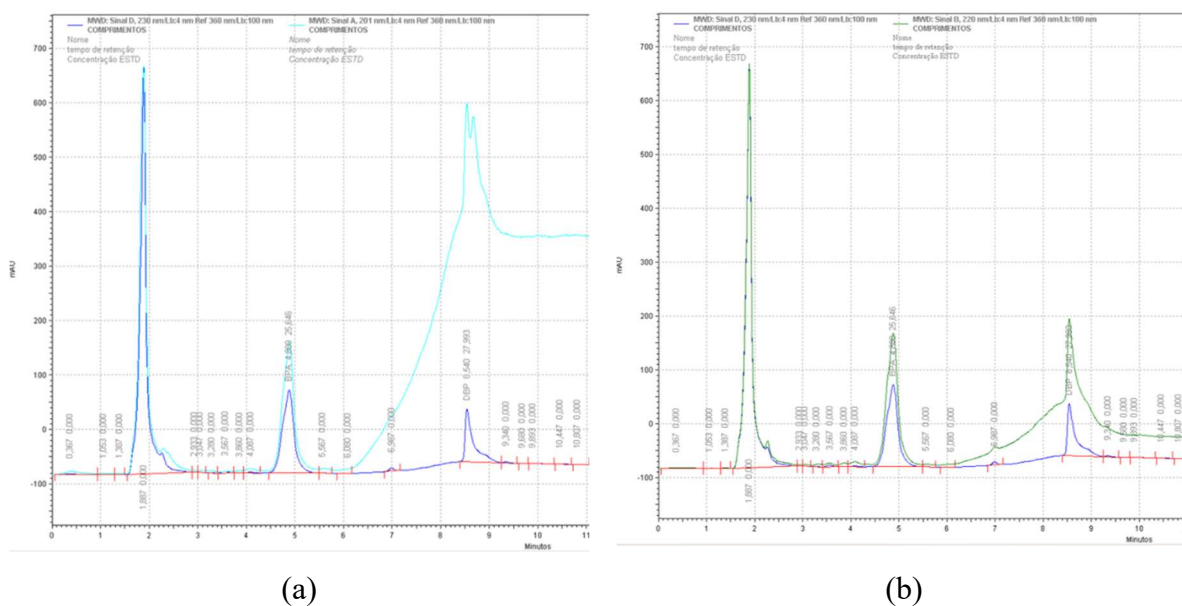
O método proposto para a determinação de bisfenol A e ftalatos foi desenvolvido empregando HPLC-UV. Teste preliminares usando GC-FID demonstrou viabilidade, entretanto era necessário realizar uma etapa de derivatização da amostra para a análise de bisfenol A, enquanto que no HPLC essa etapa é desnecessária. Em acréscimo, o cromatógrafo líquido apresentou uma adequada separação dos ftalatos, sendo possível determinar as duas classes de compostos com boa seletividade, empregando detecção UV.

### 5.1. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

#### 5.1.1. Seleção do Comprimento de Onda

Foram realizados testes comparativos entre os comprimentos de onda de 230 nm e comprimentos citados na literatura (201, 220, 260, 277, 280, 307 e 350 nm) com o intuito de avaliar os sinais (picos) com a melhor definição, e os cromatogramas são apresentados na figura 11.

**Figura 11 – Cromatogramas obtidos comparando o comprimento de onda de 230 nm (em azul) e os comprimentos de onda citados na literatura. a) 201 nm, (b) 220 nm, (c) 260 nm, (d) 277 nm, (e) 280 nm, (f) 307 nm e (g) 350 nm.**







De modo geral, observa-se, na figura 11, que o comprimento de onda de 230 nm (representado pela linha azul nos cromatogramas) apresenta maior estabilidade na linha de base do que os comprimentos de onda de 201, 260, 277, 280, 307 e 350 nm (representados pelas linhas nas outras cores dos cromatogramas).

No cromatograma comparativo dos comprimentos de 230 e 260 nm (Figura 11c), pode-se observar uma boa estabilidade no sinal do comprimento de 260 nm, entretanto, a intensidade dos picos no comprimento de 230 nm são maiores. A instabilidade na linha de base pode ser observada nos outros cromatogramas apresentados nas figuras 11d e 11e, após o pico do DBP, em aproximadamente 9 min da corrida. Sendo para os cromatogramas das figuras 11a, 11b e 11f uma grande variação na linha de base quando a fase móvel sofre variação no gradiente. Na figura 11g a linha base está muito elevada, cobrindo todos os picos.

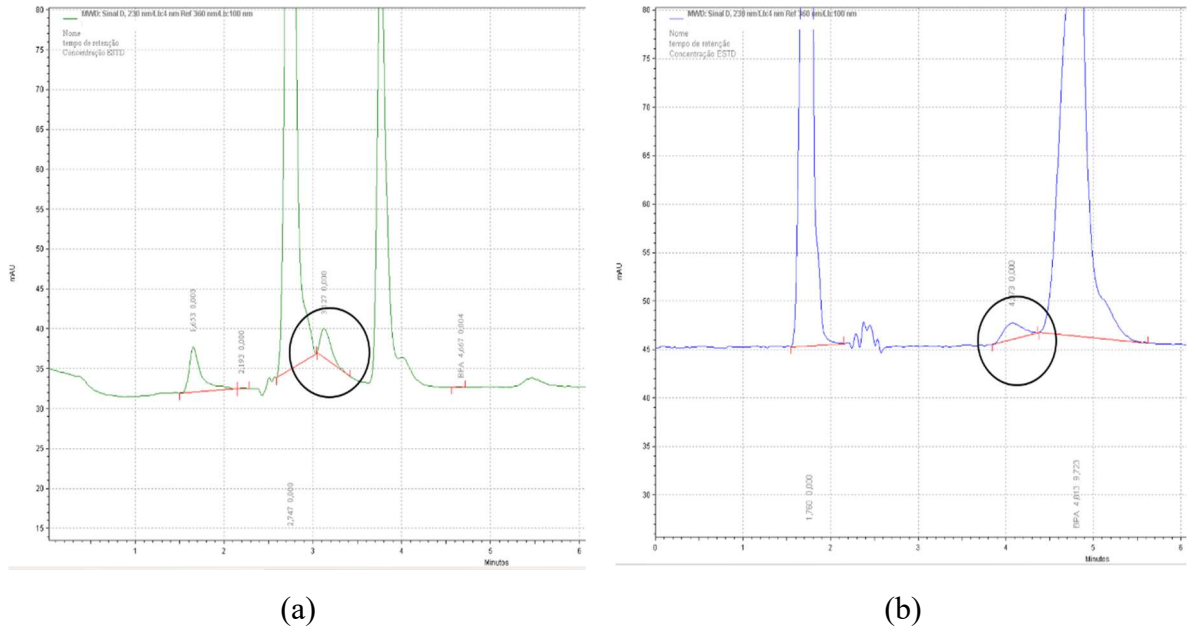
Assim sendo, o comprimento de onda de 230 nm é a melhor opção frente aos outros comprimentos, pois apresenta melhor estabilidade da linha de base e com boa intensidade dos picos, sendo o comprimento de onda escolhido para o método. Corroborando com o citado por Beltrán (2017), o qual o espectro de absorção máximo obtido foi no comprimento de onda de 230 nm, devido à transição  $\pi$ - $\pi$  \* dos anéis aromáticos C-C e n- $\pi$  \* da ligação C = O.

### 5.1.2. Fase Móvel

Para a avaliação da fase móvel foram utilizados metanol grau HPLC e água para gerar gradientes, visando uma melhor separação dos compostos. Os resultados desse estudo são apresentados na figura 12.

Primeiramente, optou-se uma fase móvel isocrática com uma proporção de 95:5 metanol:água. Entretanto, no início da corrida foi observado um sinal interferente próximo ao pico do bisfenol A (Figura 12a). Desta forma, foi iniciada a corrida com eluição por gradiente com fase orgânica menor, em torno de 70:30 metanol:água para separar o pico do interferente (Figura 12b), com posterior aumento da fase orgânica para uma eluição mais rápida dos ftalatos. Os ftalatos não apresentaram interferentes para a fase móvel na proporção de 95:5. A fase móvel isocrática de 70:30 metanol:água proporciona uma corrida mais longa (90 min) devido à interação dos ftalatos com a fase estacionária na eluição dos ftalatos.

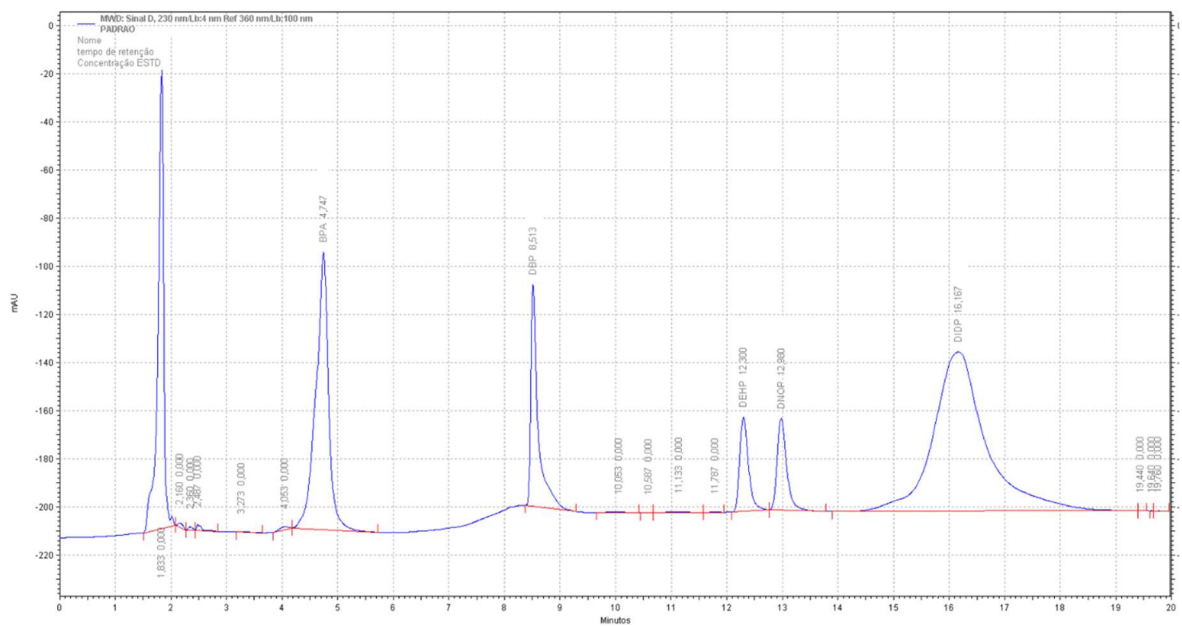
**Figura 12 – Cromatogramas obtidos com eluição isocrática de proporção 95:5 metanol:água (a) e eluição gradiente iniciando na proporção de 70:30 metanol:água (b). Destaque para o sinal interferente da linha de base próximo ao sinal do bisfenol A**



Fonte: Esquema a partir do *Print screen* do programa EZChrom Elite

Desta foram o tempo total de uma corrida foi de 20 minutos, como mostra a figura 13.

**Figura 13 – Cromatograma obtido após estabelecer o modo de eluição gradiente da fase móvel metanol:água.**



Fonte: *Print screen* do programa EZChrom Elite

Os picos foram avaliados pelos parâmetros cromatográficos mostrados na tabela 10, tendo a resolução como o fator que expressa uma boa separação dos picos. Para isso, utiliza os valores a seguir:

- 0,6 valor mínimo necessário para diferenciar o vale entres picos de mesma altura
- 1,6 valor que garante um resultado qualitativo mais preciso
- Maior que 1,7 valores para métodos robustos

**Tabela 10 – Parâmetros cromatográficos de qualidade e definição dos picos**

<b>Parâmetros</b>	BPA	DBP	DEHP	DNOP	DIDP
<b>Tempo de retenção (t) em min</b>	4,474	8,513	12,300	12,980	16,167
<b>Largura da base (W) em min</b>	1,35	0,95	0,45	1	5,7
<b>Intensidade em mAU</b>	118	91	39	38	63
<b>Número de pratos (N)</b>	140,838	1431,529	4940,082	2695,686	138,246
<b>Fator de retenção (k)</b>	2,59	4,64	6,71	7,08	8,82
<b>Interação picos</b>	BPA com DBP	DBP com DEHP	DEHP com DNOP	DNOP com DIDP	
<b>Fator de seletividade (<math>\alpha</math>)</b>	1,793	1,444	1,055	1,246	
<b>Resolução (<math>R_s</math>)</b>	3,01	4,73	0,8	0,98	
<b>Fonte: Autor</b>					

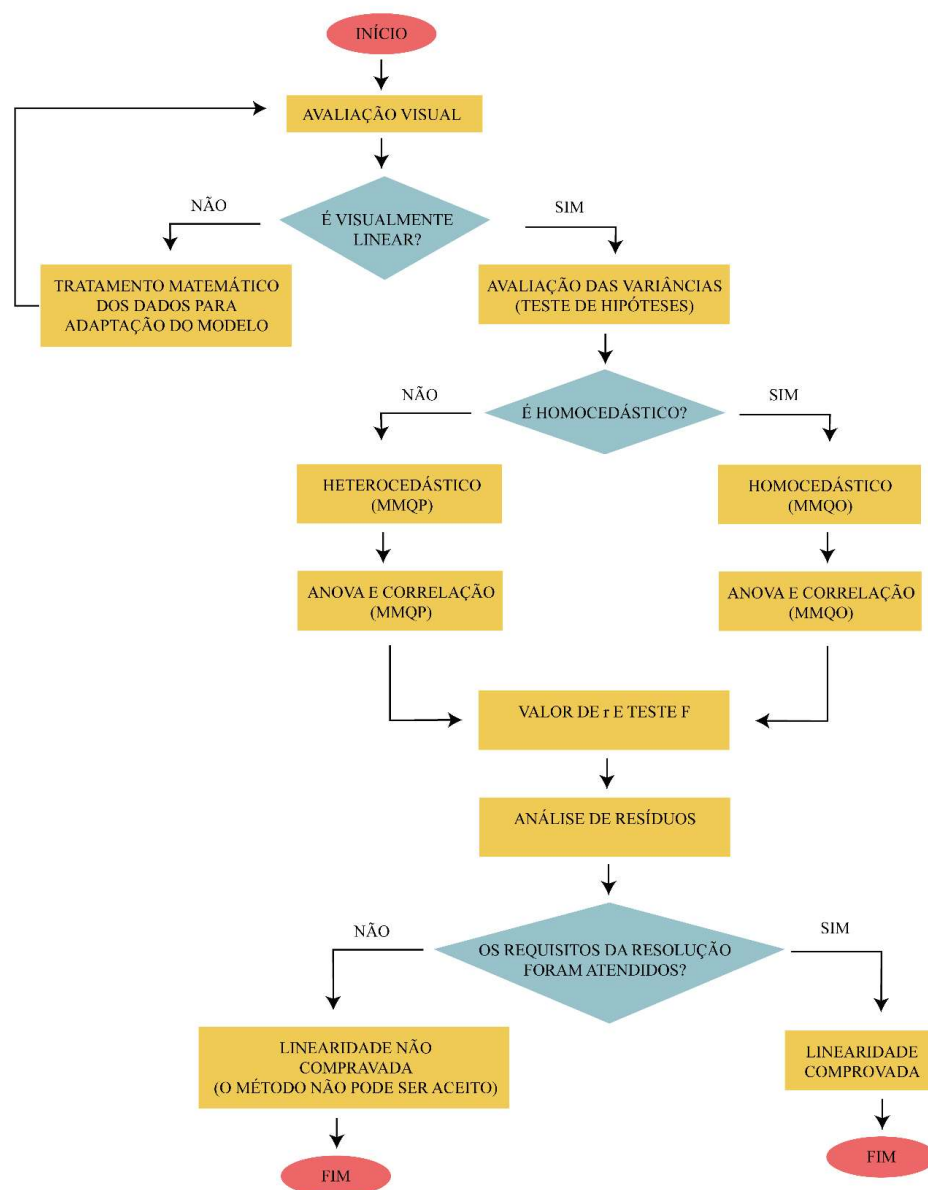
Em todas as interações entre os picos os valores de  $R_s$  foram acima de 0,6, mostrando que é possível ver a separação entre os picos. Contudo, os valores das interações entre o DEHP com o DNOP apresentaram um valor de 0,8 que é bem próximo ao mínimo. Isso pode ser explicado pela proximidade entre esses picos mostrado no fator de seletividade de 1,055, sendo para este fator o valor 1 coeluição dos picos (tabela 10).

Para a interação DNOP e DIDP o valor de 0,98 para a  $R_s$  é justificado devido ao grande alargamento da base do pico, que pode ser observado no número de pratos (N) (tabela 10). O N é a interação entre o tempo de retenção e a largura do pico, sendo valores mais baixos o indicativo de uma separação inferior.

## 5.2. VALIDAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO

Como citado anteriormente, este método foi validado pelo *Guia para Tratamento Estatístico de Validação Analítica* da ANVISA (nº10/2017) que segue a lógica do Fluxograma mostrado na figura 14 para obter a aceitação do método.

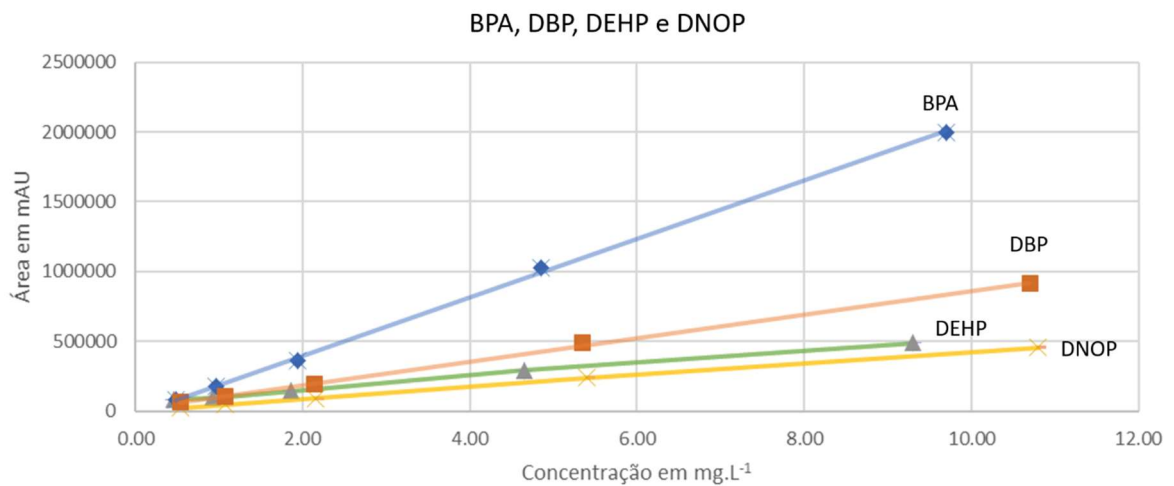
**Figura 14 – Fluxograma para avaliação de linearidade**



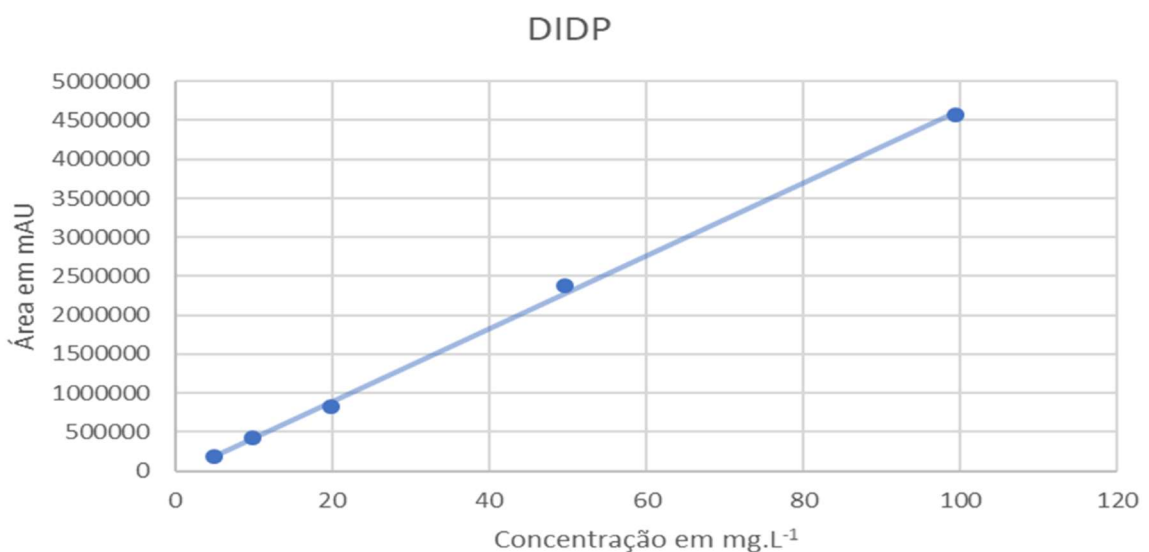
### 5.2.1. Curva Analítica e Linearidade

Considerando o fluxograma mostrado na figura 14, iniciou-se a avaliação da curva analítica. O primeiro passo é a avaliação visual das curvas, sendo facilmente observada a linearidade, como apresentada na figura 15, onde pose-se observar as curvas analíticas do BPA, DBP, DEHP e DNOP (figura 15a) e DIDP (figura 15b).

**Figura 15 – Curvas analíticas obtidas para bisfenol A e ftalatos BBP, DEHP e DNOP na faixa de concentração de 0,5 a 10 mg L<sup>-1</sup> (a) e DIDP na faixa de 5 a 100 mg L<sup>-1</sup> (b)**



(a)



(b)

Fonte: Autor

As curvas representadas na figura 15, foram construídas a partir da média das replicatas das soluções de referência nas concentrações entre 0,5 a 10 mg L<sup>-1</sup> para o bisfenol A e os ftalatos DBP, DEHP e DNOP e 5 a 100 mg L<sup>-1</sup> para o DIDP, sendo possível observar que as curvas apresentam linearidade. Em seguida, avaliou-se as variâncias, sendo as curvas analisadas quanto à sua homocedasticidade, ANOVA e correlação.

As curvas apresentadas na figura 15 são homocedásticas, sendo comprovadas pelo teste de Cochran (ANVISA, Guia n° 10/2017) e pela análise de resíduos. Para o teste, compara-se os valores de C e C<sub>crítico</sub>, e utiliza-se a fórmula representada na equação 8, sendo o S a variância no eixo y.

$$C = \frac{S^2_{\text{Max}}}{\sum S^2} \quad (\text{Eq. 8})$$

Na tabela 11, são mostrados os valores de C encontrados e o C<sub>crítico</sub> para as curvas analíticas dos compostos analisados. Os resultados demonstram que a hipótese nula (homocedástica) é aceita, ao verificar  $C < C_{\text{crítico}}$ . Também é possível observar a equação da reta das respectivas substâncias analisadas, bem como a correção expressa no valor de r<sup>2</sup>. O r<sup>2</sup> valida a linearidade da reta ao apresentar valor acima de 0,990, desta forma, todas as curvas são homocedásticas com valores de correlação aceitáveis de acordo com o *Guia para Tratamento Estatístico de Validação Analítica* da ANVISA (ANVISA, n°10/2017).

**Tabela 11 – Dados do teste de Cochran, equação da reta e coeficiente de correlação para as curvas analíticas de BPA, DBP, DEHP, DNOP e DIDP**

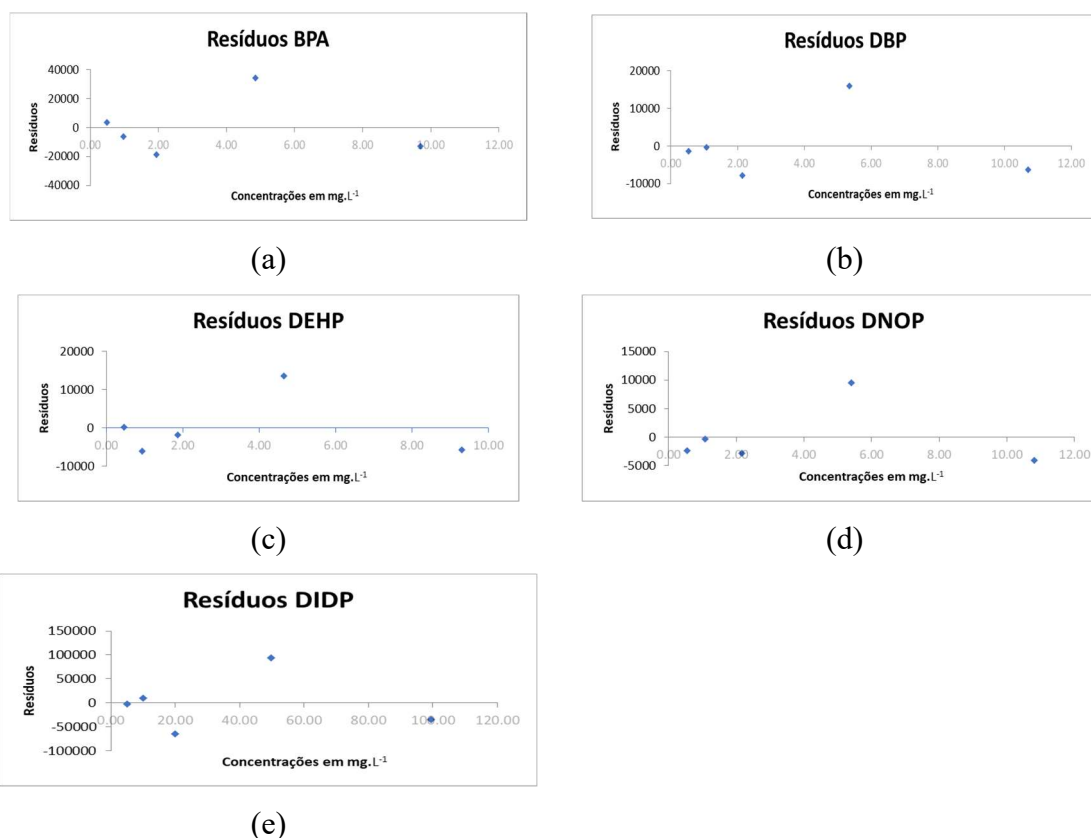
Curvas	C	C <sub>crítico</sub>	Equação da reta*	Correlação (r <sup>2</sup> )
BPA	0,436	0,684	y = 209436x - 20881	0,9993
DBP	0,322	0,684	y = 84223x + 20899	0,9993
DEHP	0,301	0,684	y = 46816x + 60757	0,9978
DNOP	0,579	0,684	y = 42458x + 3932.6	0,9991
DIDP	0,127	0,684	y = 46802x - 47394	0,9989

\*y é o sinal analítico e x é a concentração, em mg L<sup>-1</sup>.

Fonte: Autor

Os gráficos de análise de resíduos também são uma alternativa de análise para comprovar a homocedasticidade ao apresentar uma distribuição constante da variância, como mostrado na figura 16.

**Figura 16 – Gráficos de distribuição de resíduos em função das concentrações de BPA (a), DBP (b), DEHP (c), DNOP (d) e DIDP (e).**



Fonte: Autor

Como pode ser observado nos gráficos dos resíduos, não existe uma tendência na dispersão dos pontos, o que confirma a homocedasticidade para as curvas analíticas analisadas. Como último passo para a validação da curva analítica tem-se a análise de variância (ANOVA), que valida através do teste F e valor-p, a linearidade da curva analítica.

### 5.2.2. Análise de Variância (ANOVA)

Para a ANVISA (Guia n° 10/2017), o teste F é um valor crítico que avalia se a regressão é satisfatória, se existe uma relação confiável entre a concentração e o sinal. Rejeita-se a hipótese nula, regressão satisfatória, quando  $F_{\text{calculado}} \geq F_{\text{crítico}}$ .



**Tabela 12 – Dados obtidos da ANOVA para bisfenol A e ftalatos**

<b>Bisfenol A</b>						
FV	GL	SQ	MQ	F	Valor-p	F <sub>crítico</sub>
<b>Entre grupos</b>	4	7,657E+12	1,91424E+12	48830,04678	2,11002E-21	3,478049691
<b>Dentro dos grupos</b>	10	392021637	39202163,67			
<b>Regressão</b>	1	2,55056E+12	2,55056E+12	4348,06511		7,68541E-06
<b>Resíduo</b>	3	1759793005	586597668,2			
<b>DBP</b>						
FV	GL	SQ	MQ	F	Valor-p	F <sub>crítico</sub>
<b>Entre grupos</b>	4	1,50679E+12	3,76697E+11	6753,709603	4,16104E-17	3,478049691
<b>Dentro dos grupos</b>	10	557762730	55776273			
<b>Regressão</b>	1	5,01905E+11	5,01905E+11	4210,176181		8,06583E-06
<b>Resíduo</b>	3	357636836,8	119212278,9			
<b>DEHP</b>						
FV	GL	SQ	MQ	F	Valor-p	F <sub>crítico</sub>
<b>Entre grupos</b>	4	3,52222E+11	88055486085	1044,87328	4,63958E-13	3,478049691
<b>Dentro dos grupos</b>	10	842738424	84273842,4			
<b>Regressão</b>	1	1,17148E+11	1,17148E+11	1356,092979		4,40438E-05
<b>Resíduo</b>	3	259159564,2	86386521,42			
<b>DNOP</b>						
FV	GL	SQ	MQ	F	Valor-p	F <sub>crítico</sub>
<b>Entre grupos</b>	4	3,90203E+11	97550752925	2928,834434	2,7053E-15	3,478049691
<b>Dentro dos grupos</b>	10	333070220	33307022			
<b>Regressão</b>	1	1,29946E+11	1,29946E+11	3212,02007		1,21009E-05
<b>Resíduo</b>	3	121368763,9	40456254,62			
<b>DIDP</b>						
FV	GL	SQ	MQ	F	Valor-p	F <sub>crítico</sub>
<b>Entre grupos</b>	4	4,01673E+13	1,00418E+13	3749,505778	7,87576E-16	3,478049691
<b>Dentro dos grupos</b>	10	26781715609	2678171561			
<b>Regressão</b>	1	1,33747E+13	1,33747E+13	2793,358409		1,49184E-05
<b>Resíduo</b>	3	14364138320	4788046107			

**FV, fonte de variação; GL, graus de liberdade; SQ, soma dos quadrados; MQ, média dos quadrados, F, estatística da análise de variância; Valor-p, probabilidade da estatística calculada; F<sub>crítico</sub>, valor para aceitação da hipótese nula.**

**Fonte: Autor**

Na tabela 12 são mostrados os dados da ANOVA para o bisfenol A e para os ftalatos e, observa-se que o  $F_{\text{calculado}}$  é maior que o  $F_{\text{crítico}}$  para todas as curvas analíticas, entre grupos e para a regressão, comprovando a linearidade da curva.

Quando o valor- $p$  é menor que 0,005 a regressão possui um nível de confiança de 95% (BAZÍLIO, 2014). Pode-se observar na tabela 11 que para todas as análises o valor- $p$  obteve resultados abaixo do valor de 0,001, conferindo às curvas analíticas uma confiabilidade de 99%.

Analizados todos os pontos necessários para a validação da curva analítica, pode-se afirmar que a linearidade das curvas analíticas está de acordo com a ANVISA (Guia n° 10/2017).

### 5.2.3. Limite de Detecção e de Quantificação

Os cálculos dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram realizados empregando as fórmulas mencionadas na secção 3.6.3. e os resultados são apresentados na tabela 13 (expressos em  $\text{mg L}^{-1}$ ), para cada analito.

**Tabela 13 – Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para bisfenol A e ftalatos**

Compostos	LD ( $\text{mg L}^{-1}$ )	LQ ( $\text{mg L}^{-1}$ )
BPA	0,0035	0,0107
DBP	0,0347	0,1053
DEHP	0,0512	0,1551
DNOP	0,0395	0,1198
DIDP	0,0489	0,1483

**Fonte: Autor**

É importante observar que os LQs correspondem ao desejado para o método diante da concentração mínima desejada.

O limite de detecção encontrado para o bisfenol A (Tabela 13) foi maior que o estimado por Altannak (2015) com LD de  $0,0004 \text{ mg L}^{-1}$  e Lopes (2016) com LD de  $0,003 \text{ mg L}^{-1}$ . Contudo,

verificou-se um LD menor que estimados por Paula (2014) e Arce (2017) com LDs de 0,0075 mg L<sup>-1</sup> e 0,05 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente (Tabela 13). Esta observação, corrobora que o método proposto é adequado para a análise de bisfenol A.

Para os ftalatos, os LDs (Tabela 13) apresentam resultados maiores que os estimados por Sá (2013) e Beltrán (2017) que apresentaram LDs de 0,00027 mg L<sup>-1</sup> e 0,0024 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Esse melhor LD apresentado pelos autores pode ser justificado diante da pré concentração realizada em seus métodos, sendo realizado SPE com cartuchos C18.

#### 5.2.4. Precisão

A tabela 14 mostra os valores de DPR bem como os valores de HO<sub>R</sub> para as soluções de referência utilizadas nas curvas de calibração. Como pode ser observado todos os valores de HORRAT são menores que 2, comprovando precisões dentro do aceitável.

**Tabela 14 – Valores de DPR e HO<sub>R</sub> por concentração em soluções de referência**

Compostos	BPA	DBP	DEHP	DNOP	DIDP
<b>Concentração (mg L<sup>-1</sup>)</b>	0,408	0,749	1,450	0,563	3,536
<b>DPR</b>	6,984	8,141	8,672	6,617	1,179
<b>HO<sub>R</sub></b>	0,381	0,487	0,573	0,379	0,089
<b>Concentração (mg L<sup>-1</sup>)</b>	0,851	1,283	1,720	1,136	8,296
<b>DPR</b>	1,229	5,421	2,445	5,710	11,130
<b>HO<sub>R</sub></b>	0,075	0,352	0,166	0,364	0,957
<b>Concentração (mg L<sup>-1</sup>)</b>	1,773	2,241	2,556	2,131	15,890
<b>DPR</b>	0,853	3,691	6,631	3,457	8,934
<b>HO<sub>R</sub></b>	0,058	0,261	0,477	0,242	0,847
<b>Concentração (mg L<sup>-1</sup>)</b>	4,978	5,652	5,115	5,575	46,098
<b>DPR</b>	0,481	0,697	2,305	2,091	0,577
<b>HO<sub>R</sub></b>	0,038	0,057	0,184	0,169	0,064
<b>Concentração (mg L<sup>-1</sup>)</b>	9,661	10,620	8,588	10,528	88,795
<b>DPR</b>	0,377	0,845	1,877	1,750	0,738
<b>HO<sub>R</sub></b>	0,033	0,075	0,162	0,156	0,090
<b>Fonte:</b>					

### **5.3. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DO MÉTODO PROPOSTO**

Após realizar a validação da calibração buscou-se avaliar os diferentes parâmetros que influenciam no desenvolvimento do método, tais como o solvente de extração que foi avaliado de forma univariada e os fatores que afetam a extração assistida por ultrassom (tempo, temperatura, volume do extrator e massa da amostra). Para tanto, foram estudados empregando a análise multivariada com auxílio de planejamento fatorial.

#### **5.3.1. Avaliação da escolha do solvente**

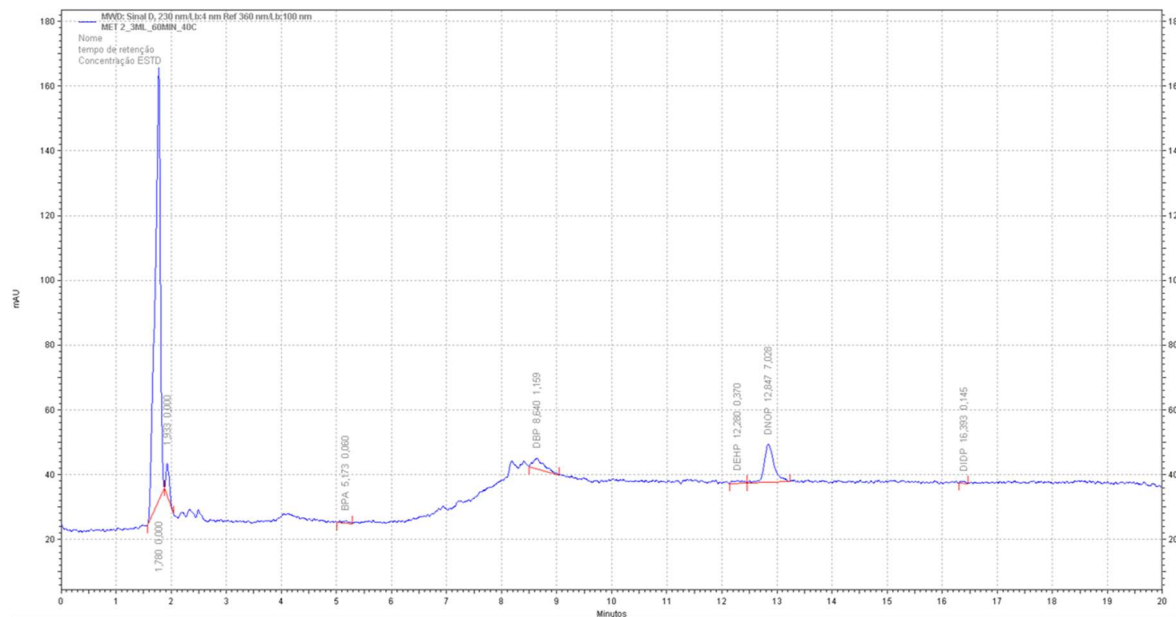
Para a escolha do solvente a ser usado na extração do bisfenol A e dos ftalatos em questão, foram utilizados como base os trabalhos de Akkbik (2019), Özer (2011) e Ting (2019). Assim como o método proposto pela ABNT (2018), eles partiram da extração líquida direta de uma solução extratora em contato com o utensílio/brinquedo e, posterior, preparo da solução extraída, para a injeção no equipamento selecionado.

Akkbik (2019) utilizou 0,5 g da amostra em 1 mL de metanol e realizou a extração assistida por ultrassom por 40°C, durante 30 minutos. Özer (2011) usou 0,02 g de amostra para 100 mL de clorofórmio, também extraiu em banho de ultrassom por 30 minutos à temperatura ambiente. Ting (2009) utilizou 1 g de amostra com 8 mL de diclorometano, em temperatura ambiente e sob agitação por 1 hora.

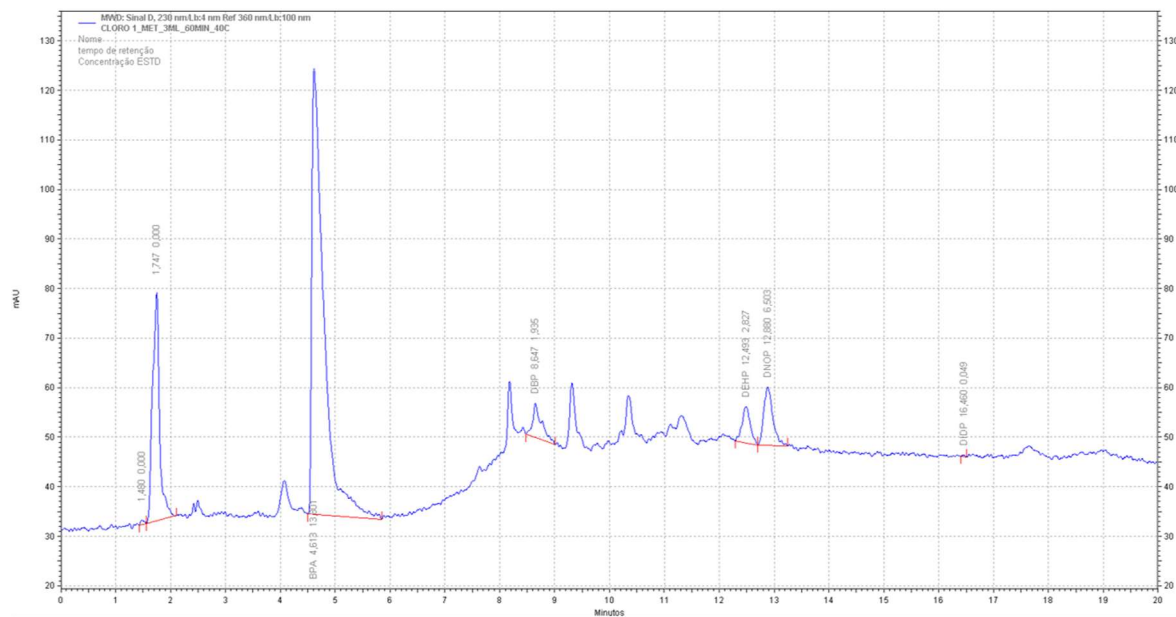
Partindo-se dessas soluções extratoras, metanol, clorofórmio e diclorometano, foi realizado um teste afim de verificar qual dos solventes resultaria em melhor extração. Para tanto, foi pré-estabelecida uma condição fixa a ser utilizada com 6 mL de solução extratora (solvente), 1 g de amostra, temperatura de 40°C por 45 minutos em sonicação.

Podemos observar nos cromatogramas apresentados na figura 17, que o clorofórmio apresentou uma melhor extração, pois apresentam picos de maior intensidade. A tabela 15 mostra as concentrações em mg L<sup>-1</sup> dos compostos encontrados, confirmando o clorofórmio como melhor extrator.

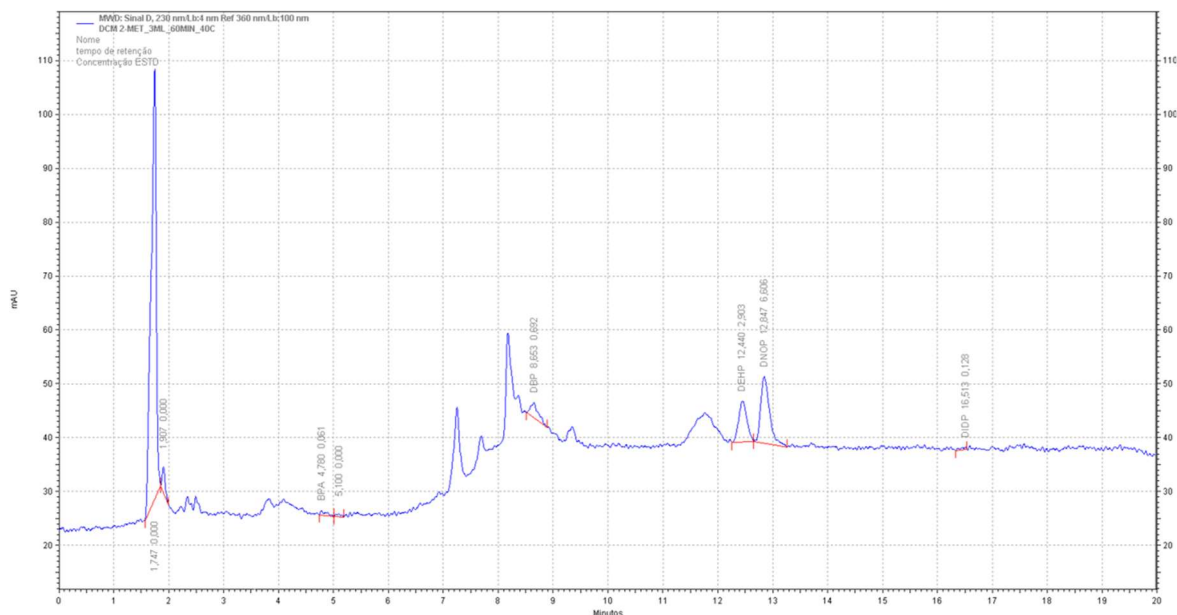
**Figura 17 - Cromatogramas obtidos para bifenol A e ftalatos com as soluções extratoras de metanol (a), clorofórmio (b) e diclorometano (c)**



(a)



(b)



(c)

Fonte: *Print screen* do programa EZChrom Elite

**Tabela 15 – Concentrações dos compostos (BPA, DBP, DEHP, DNOP e DIDP) extraídos para solução extratora de metanol, clorofórmio e diclorometano**

compostos	Metanol (mg L <sup>-1</sup> )	Clorofórmio (mg L <sup>-1</sup> )	Diclorometano (mg L <sup>-1</sup> )
<b>BPA</b>	0,012	13,596	0,061
<b>DBP</b>	1,159	1,935	0,692
<b>DEHP</b>	5,360	5,602	5,038
<b>DNOP</b>	0,140	0,350	0,153
<b>DIDP</b>	0,051	1,092	0,141

Fonte: Autor

A partir desses estudos, definiu-se que o método terá como solução extratora o clorofórmio, HPLC como equipamento de leitura e banho ultrassom como equipamento de preparo das amostras.

### 5.3.2. Planejamento Fatorial

O planejamento fatorial foi realizado conforme a pré determinação dos valores e fatores mostrados na secção 4.6.1., sendo o fator A tempo no banho ultrassônico, fator B Temperatura do banho ultrassônico, fator C volume do solvente e fator D massa da amostra. Todos as

análises foram realizadas e os resultados das áreas encontradas foram inseridas na planilha, como mostra a tabela 16.

**Tabela 16 – Resultados das injeções para o planejamento fatorial completo 2<sup>4</sup> para otimização da extração de bisfenol A e ftalatos em amostras de utensílios para lactentes a partir do design expert**

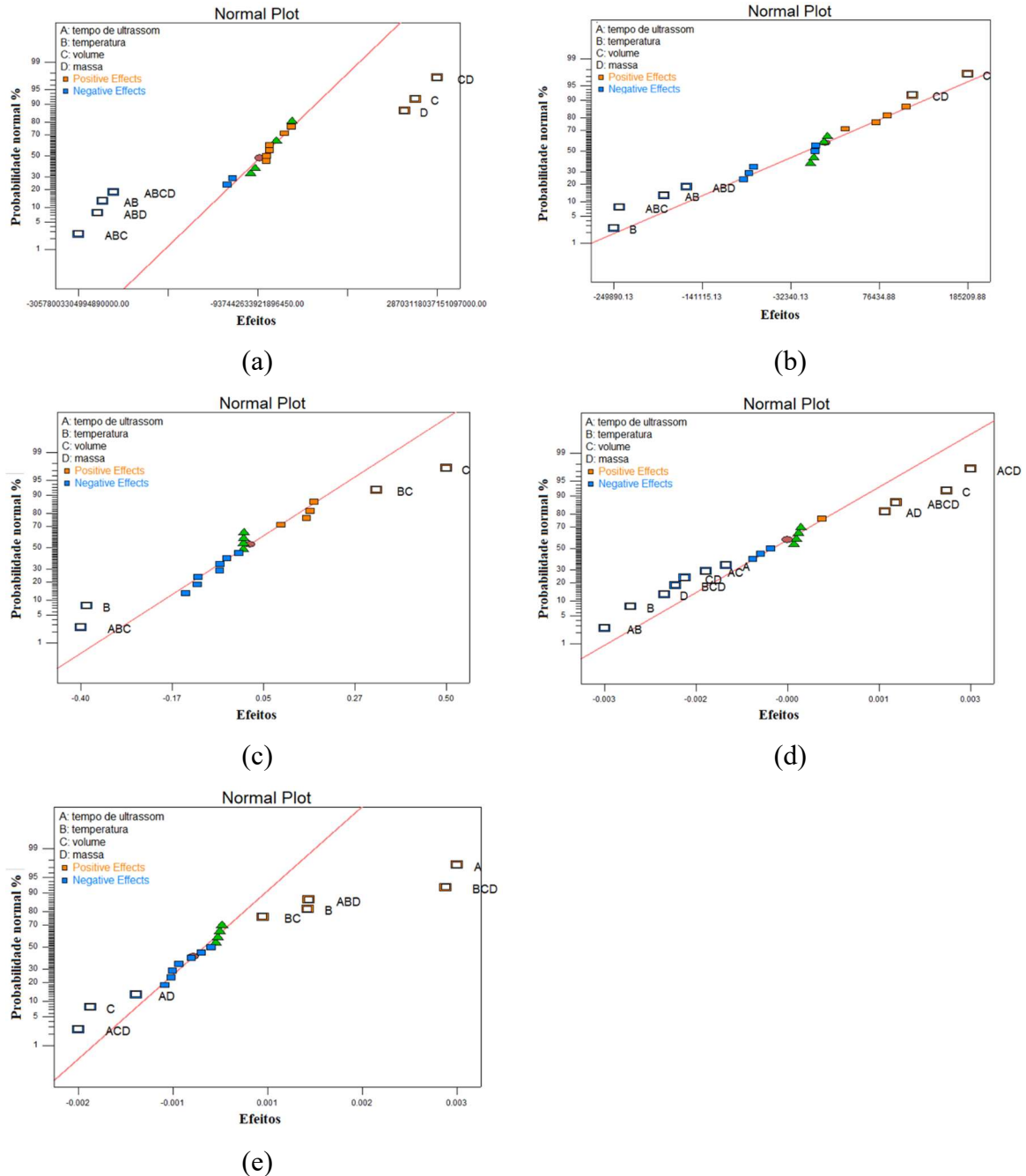
Fator a (min)	Fator B (°C)	Fator C (mL)	Fator D (g)	BPA	DBP	DEHP	DNOP	DIDP
20	65	2	1,5	710329	254053	18118	6773	429096
20	65	10	1,5	4,638E+6	664466	352744	23599	27614
60	25	2	0,5	1,820E+6	368945	242459	6281	22839
60	65	10	1,5	239939	105069	129822	19817	25767
60	25	10	0,5	1,789E+6	565422	296252	6388	13874
20	25	10	1,5	240524	226512	84764	8605	327750
60	25	2	1,5	442351	170407	66808	7564	13656
40	45	6	1,0	6,245E+6	1,084E+6	717873	5475	26465
20	25	2	0,5	2,679E+6	714524	310443	11214	360417
40	45	6	1,0	6,145E+6	1,142E+6	723867	5073	21690
60	65	2	0,5	73677	58222	70961	17494	14300
20	25	10	0,5	425282	476313	157478	4015	363761
20	65	2	0,5	170078	128528	12012	19502	15784
20	25	2	1,5	1,464E+6	274578	93604	22536	31175
20	65	10	0,5	1,673E+6	398541	216780	291	208674
40	45	6	1,0	6,173E+6	994967	706759	5926	24955
60	25	10	1,50	4,917E+6	1,006E+6	574929	4938	333903
60	65	10	0,5	656232	101657	135484	17453	23314
60	65	2	1,50	256693	93204	45616	38510	20551
40	45	6	1,0	6,242E+6	1,149E+6	704252	5784	29374
40	45	6	1,0	6,019E+6	1,085E+6	689949	6313	28591

**Fonte: Autor**

No processamento e avaliação dos dados foi realizada uma avaliação dos fatores que apresentaram efeitos significativos em cada um dos compostos. Esses gráficos, chamados de *Normal plot*, são feitos a partir do *software* Design Expert que mostra o efeito das variáveis em função da probabilidade normal. Para simplificar o modelo e interpretação foram avaliados principalmente os efeitos primários dos fatores, buscando reduzir a complexidade associada às diversas interações presentes. Contudo, alguns fatores de interação serão mostrados diante da

sua importância. Na figura 18 podemos observar o *Normal plot* para cada composto avaliado e observar seus efeitos significativos.

**Figura 18 – Gráficos de Normal plot para o BPA (a) e ftalatos DBP (b), DEHP (c), DNOP (d) e DIDP (e)**



Fonte: Esquema a partir do *Print screen* do programa Design Expert

A partir do *Normal plot* da figura 18a verifica-se que o bisfenol A tem como fatores de efeito significativos o volume (C) e a massa (D). Esses fatores possuem um efeito positivo, ou



seja, à medida que se aumenta o volume e a massa utilizadas na extração dos compostos se adquire um valor otimizado da área do pico cromatográfico para o composto. É importante salientar que interações secundárias entre o tempo de ultrassom (A) e a temperatura (B) estão presentes em todos os efeitos negativos significativos, demonstrando que o aumento desses fatores prejudica a extração do bisfenol A, diminuindo sua área no cromatograma. Os ftalatos DBP (Figura 18b), DEHP (Figura 18c) e DNOP (Figura 18d), também possuem efeito positivo significativo para o fator C e negativo para o fator B. O DNOP também possui interação negativa com os fatores D e A.

Para o DIDP (Figura 18e) as interações significativas possuem um caráter oposto aos demais compostos, sendo os fatores A e B com efeitos positivos e o fator C com efeitos negativos. Essa inversão dos fatores de interação positiva causa uma dificuldade de adequar uma otimização única dos fatores para todos os compostos, visto que à medida que aumenta um fator para melhorar a resposta analítica para o DIDP, esse mesmo fator irá diminuir a resposta analítica dos demais compostos.

**Tabela 17 - Otimização numérica dos parâmetros do planejamento fatorial 2<sup>4</sup> para o bisfenol a e ftalatos**

<b>Objetivo</b>	Minimizado	Maximizado	Maximizado	Maximizado	Maximizado	Maximizado	Maximizado	Maximizado	Maximizado	Maximizado
<b>Prioridade</b>	<b>Fator A (min)</b>	<b>Fator B (°C)</b>	<b>Fator C (mL)</b>	<b>Fator D (g)</b>	BPA	DBP	DEHP	DNOP	DIDP	<b>Desejabilidade</b>
<b>1</b>	20	65,0	9,98	1,49	4,8E+6	669805	300499	19881	28721	0,859
<b>2</b>	20	65,0	10,00	1,49	4,8E+6	669457	302126	19586	28872	0,858
<b>3</b>	20	64,3	10,00	1,50	4,8E+6	666001	297460	19997	29050	0,857
<b>4</b>	20	64,5	9,96	1,50	4,8E+6	665978	295392	20025	28962	0,857
<b>5</b>	20	65,0	9,91	1,50	4,8E+6	665696	293217	19827	28937	0,856
<b>6</b>	20	65,0	10,00	1,48	4,8E+6	667007	302215	18997	29271	0,856
<b>7</b>	20	64,9	9,89	1,50	4,8E+6	664455	290184	19980	28943	0,856
<b>8</b>	20	63,9	10,00	1,50	4,7E+6	662873	295554	19832	29388	0,856
<b>9</b>	20	63,7	10,00	1,50	4,7E+6	661263	294471	19747	29557	0,855
<b>10</b>	20	65,0	9,82	1,50	4,7E+6	660565	284030	19805	29193	0,853

**Fonte: Autor**

Após as análises dos efeitos significativos para todos os compostos, foi realizada a “Otimização numérica” dos parâmetros do planejamento fatorial 2<sup>4</sup>, que visa otimização final

dos parâmetros (desejabilidade) em termos da melhor resposta analítica para os quatro compostos simultaneamente, como mostrado na tabela 17.

Como os fatores temperatura (B), volume (C) e massa (D) apresentavam interações positivas na maioria dos compostos, colocou-se como objetivo a maximização desse parâmetro. Em contrapartida, foi encontrado um melhor ajuste numérico ao minimizar o tempo de extração, já que possui uma interação negativa para a maioria dos compostos (Tabela 17). Assim, a figura 20 mostra que as dez primeiras condições otimizadas para a extração do bisfenol A e dos ftalatos possuem praticamente os mesmos valores em seus fatores. Dessa forma tem-se definido o tempo de extração no ultrassom em 20 minutos, a temperatura do banho do ultrassom em 65°C, o volume de clorofórmio para a extração em 10 mL e a massa da amostra em 1,50 g. É importante destacar que para todas as dez primeiras otimizações o nível de desejabilidade apresentou valores acima de 0,85 (85%) (Tabela 17), sendo considerado valores com alto grau de predição da otimização.

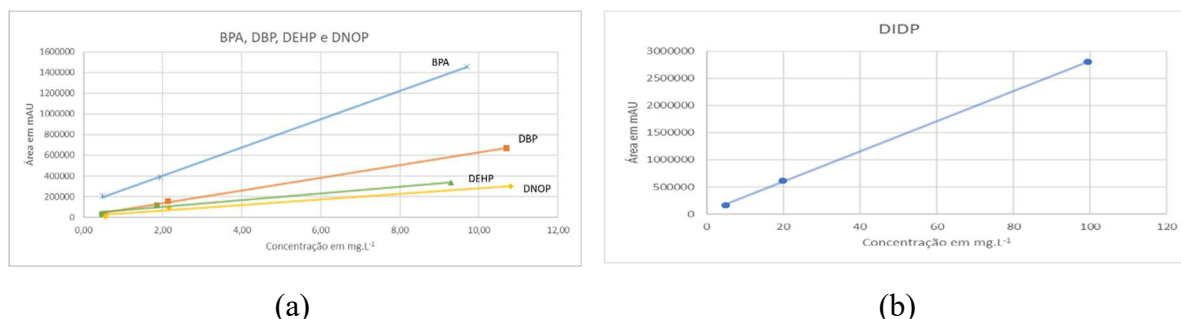
## **5.4. VALIDAÇÃO DO MÉTODO**

Após estabelecer os parâmetros do método, a validação proposta pela ANVISA (Guia nº 10/2017) recomenda que seja realizado a avaliação do efeito matriz a partir da adição de padrão. Também foi realizado teste de recuperação e a avaliação da precisão e exatidão do método proposto.

### **5.4.1. Efeito Matriz**

Para o efeito matriz, foram adicionadas as soluções de referência de 0,5 mg L<sup>-1</sup>, 2 mg L<sup>-1</sup> e 5 mg L<sup>-1</sup> para o bisfenol A e o ftalatos DBP, DEHP e DNOP, e para o DIDP nas concentrações de 5 mg L<sup>-1</sup>, 20 mg L<sup>-1</sup> e 50 mg L<sup>-1</sup>. Todas as soluções foram preparadas a partir de uma solução estoque de referência e foram realizadas injeções em triplicatas para cada nível de concentração, gerando curvas analíticas fortificadas (Figura 19).

**Figura 19 - Curvas analíticas fortificadas obtidas para bisfenol A e ftalatos BBP, DEHP e DNOP na faixa de concentração de 0,5 a 5 mg L<sup>-1</sup> (a) e DIDP na faixa de 5 a 50 mg L<sup>-1</sup> (b)**



Fonte: Autor

O efeito matriz testa se a curva analítica do método e a curva analítica fortificada são paralelas através dos testes F e t emparelhado (ANVISA RDC n° 166/2017). Para isso, se utiliza do valor da inclinação da reta (coeficiente angular) determinado por **a** na equação da reta, sendo este realizado em triplicata.

O teste F verifica as variâncias entre as inclinações, onde o valor de  $F_{\text{calculado}}$  deve ser menor que o  $F_{\text{crítico}}$ , para mostrar que as inclinações das retas são estatisticamente iguais. Na tabela 18 observa-se que esses valores de  $F_{\text{calculado}}$  são menores que os  $F_{\text{crítico}}$ , para um nível de confiança de 95%.

**Tabela 18 – Resultados dos testes F e t para o efeito matriz do bisfenol A e ftalatos**

		BPA	DBP	DEHP	DNOP	DIDP
<b>Média</b>	Curva	209436	84223	46816	42458	46802
	Matriz	196482	98831	45378	56623	49109
<b>Variância</b>	Curva	1424108	934249	1868923	748644	63870
	Matriz	68102642	39855902	1457042	373324	45502543
	<b>F<sub>calculado</sub></b>	0,020911	0,023441	1,282683	2,005347	0,001404
	<b>F<sub>crítico</sub></b>	0,052632	0,052632	19	19	0,052632
	<b>T<sub>calculado</sub></b>	2,691	-3,961	1,366	-23,162	-0,592
	<b>T<sub>crítico</sub></b>	2,920	2,920	2,132	2,132	2,920

Fonte: Autor

Como também pode ser observado na tabela 18, o teste t mostra valores de  $t_{\text{calculado}} < t_{\text{crítico}}$ . Provando que as inclinações da reta das curvas fortificadas são estatisticamente iguais as

inclinações da reta das curvas analíticas do método, ou seja, hipótese nula do teste  $t$  não rejeitada.

Os resultados dos testes  $F$  e  $t$  permitem afirmar que não existe efeito matriz para o método determinado, com um nível de confiança de 95%.

#### **5.4.2. Teste de Adição e de Recuperação**

Para a recuperação foram utilizadas três amostras, apenas a amostra 1 foi utilizada com duas concentrações diferentes. As amostras foram fortificadas no início do procedimento de extração, sendo adicionadas sobre a amostra pré-tratada e pesada.

Foi preparada uma solução de referência e realizadas diluições a partir dela para gerar padrões com diferentes valores de concentração. Os valores desses padrões foram verificados por uma injeção previa no cromatógrafo, serão encontrados na coluna “valor adicionado” da tabela 18

Em todos os casos foram realizadas injeções das amostras, injeções dos padrões usados nas amostras, para encontrar o valor real dos padrões, e injeções da recuperação (amostra fortificada). Desta forma, na amostra 1 foi adicionado aos padrões 3 e 4, amostra 2 o padrão 2 e na amostra 3 o padrão 1 (Tabela 19).

A tabela 19 mostra os valores encontrados nas injeções citadas, bem como as respectivas porcentagens de recuperação.

As recuperações encontradas estão dentro da faixa de recuperação aceitável de 70 a 125% (GALLIMBERTI, 2018), apresentando valores que variaram de 73,2 a 103,4%. Desta forma podemos afirmar, também, que o método tem uma exatidão dentro dos valores aceitáveis.

**Tabela 19 – Ensaio de recuperação**

<b>Amostra</b>	<b>Composto</b>	<b>Método proposto (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Valor adicionado (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Valor recuperado (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Recuperação (%)</b>
<b>Amostra 1</b>	BPA	0,582 ±0,051	3,390 ±0,064	3,874 ±0,370	97,5
	DBP	5,166 ±0,189	5,596 ±0,104	9,849 ±0,451	91,5
	DEHP	0,564 ±0,085	4,753 ±0,312	4,133 ±0,268	77,7
	DNOP	2,386 ±0,148	5,460 ±0,309	7,592 ±0,163	96,8
	DIDP*	4,269 ±0,918	52,113 ±0,705	50,434 ±1,490	89,5
<b>Amostra</b>	<b>Composto</b>	<b>Método proposto (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Valor adicionado (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Valor recuperado (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Recuperação (%)</b>
<b>Amostra 1</b>	BPA	0,582 ±0,051	1,263 ±0,040	1,903 ±0,097	103,2
	DBP	5,166 ±0,189	2,117 ±0,219	7,533 ±0,109	103,4
	DEHP	0,564 ±0,085	1,641 ±0,349	1,635 ±0,084	74,1
	DNOP	2,386 ±0,148	1,986 ±0,195	3,672 ±0,056	84,0
	DIDP*	4,269 ±0,918	16,279 ±1,762	17,724 ±0,332	86,3
<b>Amostra</b>	<b>Composto</b>	<b>Método proposto (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Valor adicionado (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Valor recuperado (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Recuperação (%)</b>
<b>Amostra 2</b>	BPA	0,496 ±0,010	0,641 ±0,028	1,018 ±0,046	89,6
	DBP	4,028 ±0,232	1,087 ±0,184	4,606 ±0,109	90,0
	DEHP	0,086 ±0,028	0,853 ±0,111	0,921 ±0,222	98,0
	DNOP	0,650 ±0,089	1,153 ±0,172	1,728 ±0,081	95,9
	DIDP*	8,376 ±0,655	11,441 ± 1,447	19,752 ±0,650	99,7
<b>Amostra</b>	<b>Composto</b>	<b>Método proposto (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Valor adicionado (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Valor recuperado (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Recuperação (%)</b>
<b>Amostra 3</b>	BPA	0,371 ±0,006	0,315 ±0,076	0,654 ±0,033	95,2
	DBP	0,212 ±0,120	0,461±0,162	0,633 ±0,090	94,1
	DEHP	0,152 ±0,024	0,662 ±0,333	0,596 ±0,030	73,2
	DNOP	0,105 ±0,036	0,507 ±0,099	0,462 ±0,067	75,4
	DIDP*	4,534 ±0,584	4,850 ±0,111	8,388 ±0,468	89,4

Fonte: Autor

## 5.5. ANÁLISE DAS AMOSTRAS

A extração das amostras foi realizada de acordo com o método da ABNT (2018) de LLE assistida por ultrassom. O procedimento também foi utilizado nos trabalhos de Özer (2011) e

Bomfim (2015). A LLE é vantajosa em relação a separações em fase sólidas, por não precisar preparar cartuchos e nem os regenerar, sendo possível pré-concentrar a amostra.

As amostras de brinquedos e utensílios de lactentes foram divididas em dois grupos em função das informações contidas nas embalagens. As amostras de 1 a 5 não apresentam informação sobre o uso de bisfenol A ou ftalatos em sua embalagem. As amostras de 6 a 10 indicam que não possuem bisfenol A, onde apenas a amostra 8 indica que não possui ftalatos e bisfenol A.

Na tabela 20 são apresentados os resultados dos compostos estudados empregando o método proposto.

**Tabela 20 – Resultados, em mg Kg<sup>-1</sup>, da determinação do bisfenol A e ftalatos em brinquedos e utensílios para lactentes**

Amostras	BPA	DBP	DEHP	DNOP	DIDP
Amostra 1	0,321 ±0,052	5,688 ±0,185	0,195 ±0,085	0,333 ±0,073	0,666 ±0,835
Amostra 2	0,248 ±0,010	4,886 ±0,227	< LQ	0,130 ±0,089	3,978 ±0,868
Amostra 3	0,060 ±0,006	3,030 ±0,117	0,194 ±0,024	0,127 ±0,037	2,349 ±0,531
Amostra 4	0,183 ±0,030	0,717 ±0,639	0,710 ±0,182	0,344 ±0,078	1,684 ±1,142
Amostra 5	1,145 ±0,139	21,242 ±0,429	7,136 ±0,264	2,269 ±0,133	< LQ
Amostra 6	0,853 ±0,062	1,582 ±0,049	< LQ	0,262 ±0,017	0,572 ±0,221
Amostra 7	0,744 ±0,301	1,530 ±0,172	3,200 ±0,216	0,608 ±0,149	0,681 ±0,408
Amostra 8	21,131 ±0,036	30,808 ±0,262	2,384 ±0,071	0,310 ±0,067	0,202 ±0,605
Amostra 9	1,554 ±0,124	20,396 ±0,226	1,075 ±0,147	0,369 ±0,098	0,340 ±0,456
Amostra 10	0,686 ±0,042	6,311 ±0,133	2,391 ±0,063	0,107 ±0,085*	11,336 ±0,186

LQ, abaixo do limite de quantificação

Fonte: Autor

As amostras 6 a 10, que apresentam em sua embalagem a informação de não possuir bisfenol A, revelaram concentrações deste composto acima de 0,6 mg Kg<sup>-1</sup>. A amostra 8 mostrou a maior concentração, com 21 mg Kg<sup>-1</sup>. É importante lembrar que a legislação vigente aborda restrições somente para análises de migração, não apresentando limites para análises de determinação.

Todas as amostras apresentaram a concentração de DBP com valores dentro da faixa da curva analítica, para o DEHP, duas amostras encontram-se com teores abaixo do LQ e 6 amostras estão fora da faixa da curva analítica. O único resultado que mostra o DIDP dentro dos limites da curva analítica é o apresentado na amostra 10. Somente as amostras 5 e 7

demonstram o DNOP dentro dos limites da curva analítica. O DBP apresentou maiores quantidades encontradas nas amostras de uma forma geral.

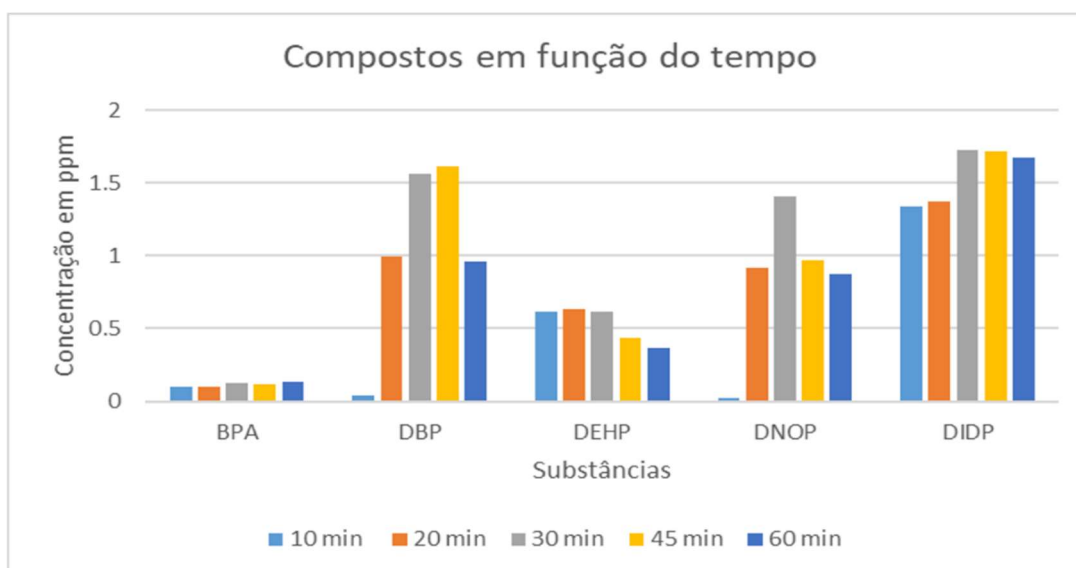
Pode-se observar que a amostra 8 possui o maior valor para o DBP, tendo também valores elevados para DEHP e bisfenol A (Tabela 20), contrariando as informações de sua embalagem. Contudo, os valores de ftalatos encontrados estão dentro do teor permitido na legislação vigente, cujo limite é de 1% (m/m).

Os desvios padrão apresentaram bons valores em geral, possuindo algumas exceções, como a amostra 4 que apresentou o desvio mais alto para o DBP. O DIDP apresentou os maiores valores de desvio padrão, contudo, sua curva analítica está entre 5 a 100 mg L<sup>-1</sup>, mostrando uma boa precisão.

## 5.6. ANÁLISE DE MIGRAÇÃO COM SALIVA ARTIFICIAL

Os ensaios de migração com saliva artificial foram realizados com as mesmas concentrações da saliva artificial e a mesma metodologia de extração dos compostos apresentadas por Al-Natsheh (2015).

**Figura 20 – Avaliação do tempo de extração dos analitos em saliva artificial em função do tempo**



Fonte: Autor

Com a finalidade de avaliar se o tempo de extração de 30 min era ideal para extrair os compostos de interesse, foi realizado um ensaio univariado, no qual os parâmetros de volume

de saliva artificial, volume de clorofórmio, quantidade da amostra e temperatura de extração foram fixados em 12,5 mL, 5 mL, 2,5 cm<sup>3</sup> e 37 °C, respectivamente, e variou-se o tempo de extração em 10, 20, 30, 45 e 60 min (Figura 20).

Na figura 20 é possível observar que a partir dos 30 minutos temos uma redução da concentração ou uma estabilidade na extração. Por isso, foi mantido o tempo de extração em 30 min.

A análise de migração foi realizada com as mesmas amostras utilizadas nas análises de determinação do bisfenol A e ftalatos. Os resultados estão apresentados na tabela 21.

**Tabela 21 – Resultados, em mg Kg<sup>-1</sup>, da migração na saliva artificial do bisfenol A e ftalatos em brinquedos e utensílios para lactentes**

Amostras	BPA	DBP	DEHP	DNOP	DIDP
Amostra 1	0,262 ±0,011	3,307 ±0,177	< LQ	0,396 ±0,093	0,431 ±0,187
Amostra 2	0,261 ±0,108	2,386 ±0,383	0,742 ±0,197	0,858 ±0,466	0,252 ±0,120
Amostra 3	< LQ	1,224 ±0,023	0,605 ±0,132	0,486 ±0,104	0,332 ±0,210
Amostra 4	0,126 ±0,012	0,246 ±0,040	0,176 ±0,056	0,122 ±0,045	0,173 ±0,106
Amostra 5	< LD	3,547 ±0,315	0,397 ±0,082	0,574 ±0,054	0,678 ±0,203
Amostra 6	0,023 ±0,016	0,723 ±0,034	0,468 ±0,148	0,311 ±0,158	< LQ
Amostra 7	0,031 ±0,019	0,369 ±0,231	0,491 ±0,037	0,293 ±0,185	< LQ
Amostra 8	0,056 ±0,008	10,265 ±0,666	0,337 ±0,440	< LQ	0,194 ±0,089
Amostra 9	0,048 ±0,048	2,562 ±0,141	< LQ	0,178 ±0,029	0,230 ±0,280
Amostra 10	0,038 ±0,013	0,742 ±0,075	1,198 ±0,120	0,158 ±0,039	2,661 ±0,835

LQ, abaixo do limite de quantificação; LD, abaixo do limite de detecção

Fonte: Autor

Os testes de migração, assim como as determinações, apresentaram alguns resultados abaixo do limite de quantificação utilizado. Além disso, a amostra 5 apresentou um resultado abaixo do limite de detecção do método (Tabela 21).

Apesar das análises de determinação do bisfenol A apresentarem valores altos, nas análises de migração com saliva artificial os resultados ficaram abaixo do valor de 0,6 mg Kg<sup>-1</sup>, desta forma todas as amostras estão de acordo com a legislação vigente (Tabela 21).

Segundo a legislação, o limite máximo de ftalatos é de 0,1% (m/m), entretanto, o DBP e DEHP que apresentam limites de 0,3 e 1,5 mg Kg<sup>-1</sup>, respectivamente, para migração específica em materiais reutilizáveis que contenham produtos não gordurosos. Tendo em vista essa especificidade, é possível observar na tabela 19 que todas as amostras, com exceção da amostra



4, seriam reprovadas quanto ao teor de DBP, por exceder a legislação. Por outro lado, todas as amostras apresentam limites de migração do DEHP aceitáveis pela legislação vigente (Tabela 21).

Cabe salientar que a legislação não aborda a migração específica para DNOP e DIDP, ainda que estes compostos também façam mal à saúde. Os resultados de migração desses compostos nas amostras analisadas podem servir de base para estudos futuros.

Pode-se observar ainda, na tabela 21, que os valores das concentrações obtidas na migração foram inferiores aos obtidos na determinação, com exceção das amostras 2, 3 e 6. Estas amostras apresentaram os ftalatos DEHP e DNOP com valores maiores na migração do que na determinação. A ocorrência dessas exceções pode estar associada ao desvio padrão, visto que os resultados das concentrações obtidas possuem valores baixos, próximos ao valor do desvio padrão.

## 6. CONCLUSÃO

As legislações brasileiras restringem o uso do bisfenol A e de alguns ftalatos em materiais plásticos devido aos riscos que eles podem causar ao sistema endócrino. Nesta pesquisa foi elaborado um método unificado para a determinação do bisfenol A e dos ftalatos DBP, DEHP, DNOP e DIDP em brinquedos e utensílios destinados à lactentes.

Atualmente, a detecção desses compostos pode ser realizada via qualquer cromatografia acoplada à detector de massas, no entanto, o método proposto neste trabalho se mostrou eficaz, com sensibilidade adequada aos limites da legislação vigente, além de ter menor custo. O método utiliza a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector UV-VIS, com uma eficiente separação dos sinais dos analitos em curto período de tempo (20 min).

A validação seguiu as indicações do *Guia para Tratamento Estatístico da Validação Analítica* da ANVISA, sendo avaliados os critérios de linearidade, limites de detecção e quantificação, com a confiabilidade testada pelo efeito matriz e ensaios de recuperação, com resultados satisfatórios que viabilizam a aplicação do método proposto.

As dez amostras de brinquedos e utensílios para lactentes foram analisadas e apresentaram teores que variaram de 0,060 mg Kg<sup>-1</sup> (bisfenol A) a 30,808 mg Kg<sup>-1</sup> (DBP).

Os testes de migração (bioacessibilidade) com saliva artificial foram realizados com o intuito de verificar a exposição dos lactentes durante o uso desses utensílios. Os resultados mostraram que todas as amostras apresentavam migrações de Bisfenol A em concentrações permitidas pela legislação vigente. No entanto, apenas 5 amostras apresentavam na embalagem a informação de que não possuíam bisfenol A em sua composição.

Das dez amostras analisadas somente 1 amostra continha informação a respeito da ausência de ftalatos na preparação. Curiosamente, esta amostra apresentou valores expressivos e foi reprovada no teste de migração dos ftalatos. Em nove amostras foram detectados valores de migração do DBP acima dos permitidos pelas normas. Este dado revela que muitos lactentes estão vulneráveis aos possíveis problemas de saúde causados pela exposição a estes compostos.

Os testes de migração foram realizados com apenas uma extração por preparo de amostra. Entretanto, a exposição repetitiva do lactente ao utensílio poderia provocar uma maior migração do composto pela saliva ao longo do tempo.

Diante dos malefícios causados por estes disruptores endócrinos faz-se necessário o aprimoramento de técnicas analíticas para fazer valer as leis de uso, bem como a revisão dos limites de migração e utilização em materiais plásticos pelas autoridades. É necessário investir

também no desenvolvimento de novos compostos que possam substituir estes disruptores endócrinos, devido a vasta utilização dos materiais plásticos na atualidade.

## **7. PERSPECTIVAS**

Como os lactentes fazem uso dos brinquedos ou utensílios de forma constante, almeja-se realizar testes sequenciais das análises de migração com saliva artificial para verificar a bioacessibilidade do tempo de uso dos materiais.

## REFERÊNCIAS

AKKBIK, Mohammed; TURKSOY, Vugar Ali; KOÇOĞLU, Serhat. Simultaneous quantitative detection of 10 phthalates in PVC children's toys by HPLC-PDA. **Toxicology Mechanisms And Methods**, [s.l.], p.1-6, 8 ago. 2019. Informa UK Limited.

AL-NATSHEH, Mais et al. Simultaneous GC-MS determination of eight phthalates in total and migrated portions of plasticized polymeric toys and childcare articles. **Journal Of Chromatography B**, [s.l.], v. 985, p.103-109, mar. 2015. Elsevier BV.

ALTANNAK, Naser F; ALSALEH, Ali. A validated UPLC-UV method for bisphenol A (BP-A) levels detection in imported plastic toys and drinking bottled water in Kuwait. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 7, p. 351-354, 20, jun. 2015. Innovare Academic Sciences.

AMANZADEH, Hatam et al. Determination of phthalate esters in drinking water and edible vegetable oil samples by headspace solid phase microextraction using graphene/polyvinylchloride nanocomposite coated fiber coupled to gas chromatography-flame ionization detector. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 1465, p.38-46, set. 2016. Elsevier BV.

ANDREA C. GORE. **INTRODUCTION TO ENDOCRINE DISRUPTING CHEMICALS (EDCs): A GUIDE FOR PUBLIC INTEREST ORGANIZATIONS AND POLICY-MAKERS**. Austin: Ipen, 2014. 69 p.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para tratamento estatístico da validação analítica, Medicamentos guia nº10 versão 1**. 2017.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada- **RDC nº 105**, de 19 de maio de 1999. Disponível em:<  
[http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RES\\_105\\_1999\\_COMP.pdf/35bc8b0b-8efb-4a66-b852-0e2d60ccc455](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RES_105_1999_COMP.pdf/35bc8b0b-8efb-4a66-b852-0e2d60ccc455). Acessado em: 18 nov. 2019.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada- **RDC nº 166**, de 24 de julho de 2017. Disponível em:<  
[http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC\\_166\\_2017\\_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401). Acessado em: 18 nov. 2019.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada- **RDC nº 17**, de 16 de abril de 2010. Disponível em:<  
[http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/res0017\\_16\\_04\\_2010.pdf/b9a8a293-f04c-45d1-ad4c-19e3e8bee9fa](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/res0017_16_04_2010.pdf/b9a8a293-f04c-45d1-ad4c-19e3e8bee9fa). Acessado em: 18 nov. 2019.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada- **RDC nº 41**, de 17 de agosto de 2009. Disponível em:<  
[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0041\\_26\\_07\\_2012.html](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0041_26_07_2012.html). Acessado em: 18 nov. 2019.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada- **RDC nº 51**, de 06 de outubro de 2011. Disponível em:<  
[http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2954239/RDC\\_51\\_2011\\_COMP.pdf/e0720f17-70fc-4eb8-b89f-acc025bdf661](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2954239/RDC_51_2011_COMP.pdf/e0720f17-70fc-4eb8-b89f-acc025bdf661). Acessado em: 18 nov. 2019.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada- **RDC nº 56**, de 06 de agosto de 2008. Disponível em:<  
[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2008/res0056\\_06\\_08\\_2008.html](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2008/res0056_06_08_2008.html). Acessado em: 18 nov. 2019.

ARCE, M.m. et al. Easy-to-use procedure to optimise a chromatographic method. Application in the determination of bisphenol-A and phenol in toys by means of liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 1534, p.93-100, jan. 2018. Elsevier BV.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 16040: Ftalatos - Determinação de plastificantes ftálicos por cromatografia gasosa**. Rio de Janeiro. 2018.

AZZAOUI, K. et al. Use of hydroxylapatite composite membranes for analysis of bisphenol A. **Research On Chemical Intermediates**, [s.l.], v. 40, n. 8, p.2621-2628, 27 fev. 2013. Springer Science and Business Media LLC.

BAZILIO, Fabio Silvestre. **Determinação Da Migração Específica Dos Plastificantes Ftalato De Di-(2-Etil-Hexila) E Adipato De Di-(2-Etil-Hexila) De Filmes Flexíveis De Pvc Para Alimentos Gordurosos: Validação De Método E Controle Sanitário Do Filme Flexível De Pvc**. 2014. 141 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Vigilância Sanitária, Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.

BOMFIM, Marcus Vinicius Justo et al. Determinação de bisfenol A em fórmulas infantis. **Vigilância Sanitária em Debate**, [s.l.], p.85-90, 27 nov. 2014. *Vigilancia Sanitaria em Debate: Sociedade, Ciencia y Tecnologia*.

BRIGANTE, Tamires Amabile Valim. **Desenvolvimento de polímeros de impressão molecular para a microextração em ponteiros de bisfenol A em amostras de urina e análise por GC-MS**. 2015. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências, Toxicologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2015.

CABRAL, Serena. **Saliva Natural vs Saliva Artificial: Composição Bioquímica**. 2012. 27 f. Monografia (Especialização) - Curso de Medicina Dentária, Faculdade de Medicina Dentária, Porto, 2012.

CACHO, Juan Ignacio et al. Gas chromatography with mass spectrometry for the determination of phthalates preconcentrated by microextraction based on an ionic liquid. **Journal Of Separation Science**, [s.l.], v. 40, n. 6, p.1310-1317, 14 fev. 2017. Wiley.

CAO, Xu-liang. A REVIEW RECENT DEVELOPMENT ON ANALYTICAL METHODS FOR DETERMINATION OF BISPENOL A IN FOOD AND BIOLOGICAL SAMPLES. **Journal Of Liquid Chromatography & Related Technologies**, [s.l.], v. 35, n. 19, p.2795-2829, jan. 2012. Informa UK Limited.

CHEN, Bin; ZHANG, Linping. An easy and sensitive analytical method of determination of phthalate esters in children's toys by UPLCMS/MS. **Polymer Testing**, [s.l.], v. 32, n. 4, p.681-685, jun. 2013. Elsevier BV.

CHEVRIER, Cécile et al. Maternal Urinary Phthalates and Phenols and Male Genital Anomalies. **Epidemiology**, [s.l.], v. 23, n. 2, p.353-356, mar. 2012. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).

ESKANDARPOUR, Niloufar; SERESHTI, Hassan. Electrospun polycaprolactam-manganese oxide fiber for headspace-solid phase microextraction of phthalate esters in water samples. **Chemosphere**, [s.l.], v. 191, p.36-43, jan. 2018. Elsevier BV.

GALLIMBERTI, Matheus. **Desenvolvimento de um método simples e rápido para determinação de bisfenol A em amostras de papéis por espectroscopia de fluorescência sincronizada**. 2018. 70 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências, Toxicologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2018.

HUANG, Y.q. et al. Bisphenol A (BPA) in China: A review of sources, environmental levels, and potential human health impacts. **Environment International**, [s.l.], v. 42, p.91-99, jul. 2012. Elsevier BV.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL – INMETRO. Portaria n.º 369, de 27 de setembro de 2007.

KABIR, Eva Rahman; RAHMAN, Monica Sharfin; RAHMAN, Imon. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. **Environmental Toxicology And Pharmacology**, [s.l.], v. 40, n. 1, p.241-258, jul. 2015. Elsevier BV.

KELEN, T. Polymer degradation. Nova Iorque: Van Nostrand Reinhold, 1983. p.152-157 In: José Marcelo Cangemi, Antonia Marli dos Santos e Salvador Claro Neto Biodegradação na redução de resíduos plásticos. *Química Nova na Escola*, 22, 2005 p. 17 - 21



KIM, Eun Jee et al. Association between urinary levels of bisphenol-A and estrogen metabolism in Korean adults. **Science Of The Total Environment**, [s.l.], v. 470-471, p.1401-1407, fev. 2014. Elsevier BV.

LEE, Soyoung et al. In-needle Microextraction Coupled with Gas Chromatography/Mass Spectrometry for the Analysis of Phthalates Generating from Food Containers. **Food Analytical Methods**, [s.l.], v. 11, n. 10, p.2767-2777, 27 abr. 2018. Springer Science and Business Media LLC.

LIMAM, Intissar et al. Simultaneous determination of phenol, methylphenols, chlorophenols and bisphenol-A by headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry in water samples and industrial effluents. **International Journal Of Environmental Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 90, n. 3-6, p.230-244, 15 mar. 2010. Informa UK Limited.

LINHARES JÚNIOR, Gilberto Ferreira. **Desenvolvimento e validação de metodologia cromatográfica para determinação de bisfenol A em simulantes de alimentos de ensaios de migração**. 2012. 101 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2012.

LOMENICK, Jefferson P. et al. Phthalate Exposure and Precocious Puberty in Females. **The Journal Of Pediatrics**, [s.l.], v. 156, n. 2, p.221-225, fev. 2010. Elsevier BV.

LOPES, Daniela. **Aplicação de membrana oca em um sistema de 96-well plate para determinação de Desreguladores endócrinos em água por HPLC**. 2016. 96 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

LV, Qing et al. Determination of Migration of Six Phthalate Esters in Plastic Toys by GC-MS/MS Coupled with Solid-Phase Extraction Using Cucurbit[n]urils as Adsorbent. **The Open Chemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.53-62, 31 out. 2017. Bentham Science Publishers Ltd.

MADALENO, Emerson et al. Estudo do Uso de Plastificantes de Fontes Renovável em Composições de PVC. **Polímeros Ciência e Tecnologia**: Ciência e Tecnologia, Vila Prudente, v. 19, n. 4, p.263-270, 2009.

MARINHO, Mary Roberta Meira; CASTRO, Walman Benicio de. Planejamento fatorial: uma ferramenta poderosa para os pesquisadores. In: congresso brasileiro de ensino de engenharia, 18., 2005, Campina Grande. **Anais...** . Campina Grande: Cobenge, 2005.

MARTÍNEZ, C. et al. Simultaneous determination of 76 micropollutants in water samples by headspace solid phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. **Talanta**, [s.l.], v. 116, p.937-945, nov. 2013. Elsevier BV.

MONTAGNER, Tiago Albano. **Desenvolvimento e validação de método de análise de bisfenol a em amostras de saliva humana por cg-em**. 2013. 84 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Química, Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2013.

MOREIRA, Miriany Avelino. **Desenvolvimento de Métodos Cromatográficos para Análise de Plastificantes, Alquilfenóis e seus Metabólitos em Alimentos e Urina**. 2014. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

NASCIMENTO, Carina de Fátima. **Desenvolvimento de procedimentos analíticos explorando microextração líquido-líquido em fluxo para a determinação de espécies de interesse em águas e leite**. 2018. 122 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2018.

OSMAN, Bilgen et al. Development and application of a solid phase extraction method for the determination of phthalates in artificial saliva using new synthesised microspheres. **Polymer Testing**, [s.l.], v. 32, n. 4, p.810-818, jun. 2013. Elsevier BV.

OTERO, Cleber Sanfelici; CARVALHO, Marilza Simonetti de. bisfenol-a e os efeitos da substância no desenvolvimento humano: a violação oculta dos direitos da personalidade na transparência e resistência do plástico. **Conpedi**, Caxias do Sul, p.252-272, fev. 2014.

ÖZER, Elif Tümay; GÜÇER, Şeref. Determination of some phthalate acid esters in artificial saliva by gas chromatography–mass spectrometry after activated carbon enrichment. **Talanta**, [s.l.], v. 84, n. 2, p.362-367, abr. 2011. Elsevier BV.

PAULA, Camila Cristina Almeida de. **Avaliação de carvões ativados para extração em fase sólida**: Um método para determinação de desreguladores endócrinos. 2014. 63 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química Analítica, Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

QUEIROZ, Fabrício Siqueira. **Estudo da degradação do policarbonato de bisfenol a (pcbfa) de garrações de água mineral**. 2012. 62 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

RASTKARI, Noushin; AHMADKHANIHA, Reza. Magnetic solid-phase extraction based on magnetic multi-walled carbon nanotubes for the determination of phthalate monoesters in urine samples. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 1286, p.22-28, abr. 2013. Elsevier BV.

REZG, Raja et al. Bisphenol A and human chronic diseases: Current evidences, possible mechanisms, and future perspectives. **Environment International**, [s.l.], v. 64, p.83-90, mar. 2014. Elsevier BV.

RIO DE JANEIRO. projeto de lei 1.310/08. Disponível em: < <https://al-rj.jusbrasil.com.br/noticias/1067754/projeto-proibe-uso-de-ftalato-em-brinquedos>>. Acesso em: 20.11.2019.

RUSSO, Mario Vincenzo et al. Extraction and GC-MS analysis of phthalate esters in food matrices: a review. **Rsc Advances**, [s.l.], v. 5, n. 46, p.37023-37043, 2015. Royal Society of Chemistry (RSC).

SÁ, Mayara Coelho. **Desenvolvimento de método analítico por cromatografia líquida para determinação de ftalatos em plásticos**. 2013. 62 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Química, Universidade Federal do Maranhão, São Luiz, 2013.

SALAZAR-BELTRÁN, Daniel et al. Determination of phthalates in bottled water by automated on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography with uv detection. **Talanta**, [s.l.], v. 168, p.291-297, jun. 2017. Elsevier BV.

SILVA, Matheus Castelo; CONFORTI, Valéria Amorim. Disruptores endócrinos. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 17, n. 9, p.1098-1111, dez. 2013.

SIRELI, Ufuk Tansel et al. Determination of Phthalate Residues in Different Types of Yogurt by Gas Chromatography-Mass Spectrometry and Estimation of Yogurt-Related Intake of Phthalates. **Food Analytical Methods**, [s.l.], v. 10, n. 9, p.3052-3062, 24 mar. 2017. Springer Science and Business Media LLC.

SONG, na Rae et al. Biomonitoring of urinary di(2-ethylhexyl) phthalate metabolites of mother and child pairs in South Korea. **Environment International**, [s.l.], v. 54, p.65-73, abr. 2013. Elsevier BV.

SWAN, Shanna H.. Environmental phthalate exposure in relation to reproductive outcomes and other health endpoints in humans. **Environmental Research**, [s.l.], v. 108, n. 2, p.177-184, out. 2008. Elsevier BV.

TELEGINSKI, Larissa. **Determinação de bisfenol a em água mineral armazenado em garrações de policarbonato**. 2016. 32 f. TCC (Graduação) - Curso de Tecnologia em Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2016.

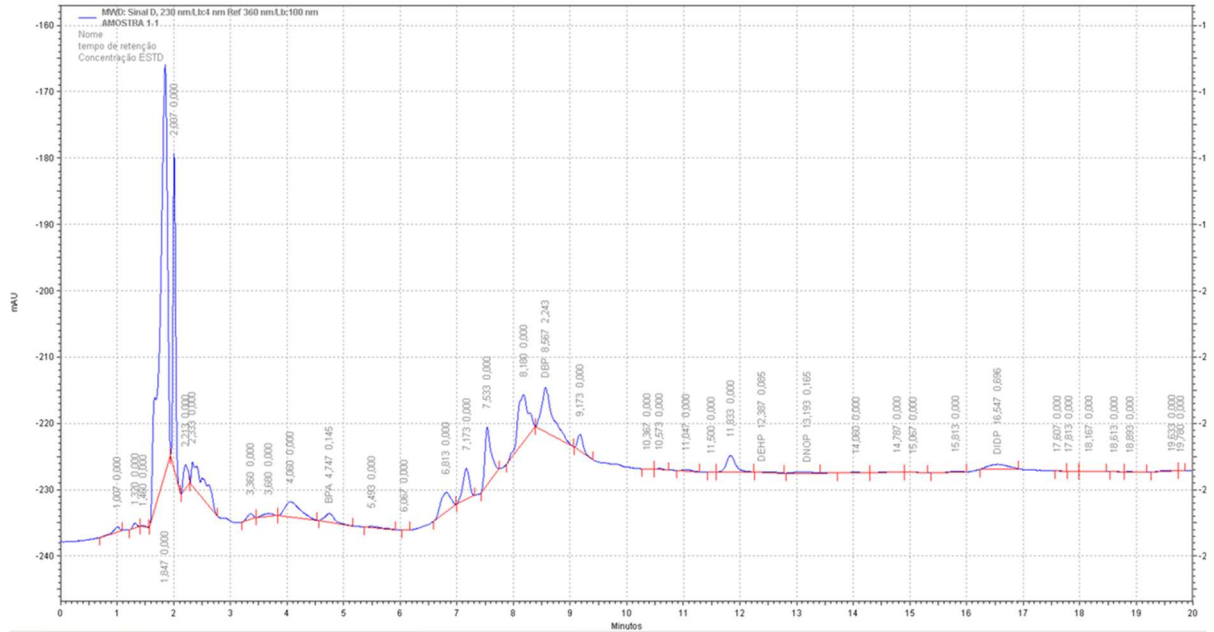
UANSIRI, Sutthirak; VICHAPONG, Jitlada; KANCHANAMAYOON, Wanna. HS-SPME for the Determination of Phthalate Esters in Vegetable Oil and Soft Drink Samples. **Chiang Mai J**, Thailand, p.1052-1061, fev. 2017.

VIÑAS, Pilar et al. Ultrasound-assisted emulsification microextraction coupled with gas chromatography–mass spectrometry using the Taguchi design method for bisphenol migration studies from thermal printer paper, toys and baby utensils. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, [s.l.], v. 404, n. 3, p.671-678, 13 abr. 2012. Springer Science and Business Media LLC.

ZAKI, Ghada Ismail Mohamed. **Determination of Phthalate Esters in Egyptian PET-Bottled water investigated under different Storage Conditions**. 2015. 74 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Science In Chemistry, Chemistry, American University, Cairo, 2015.

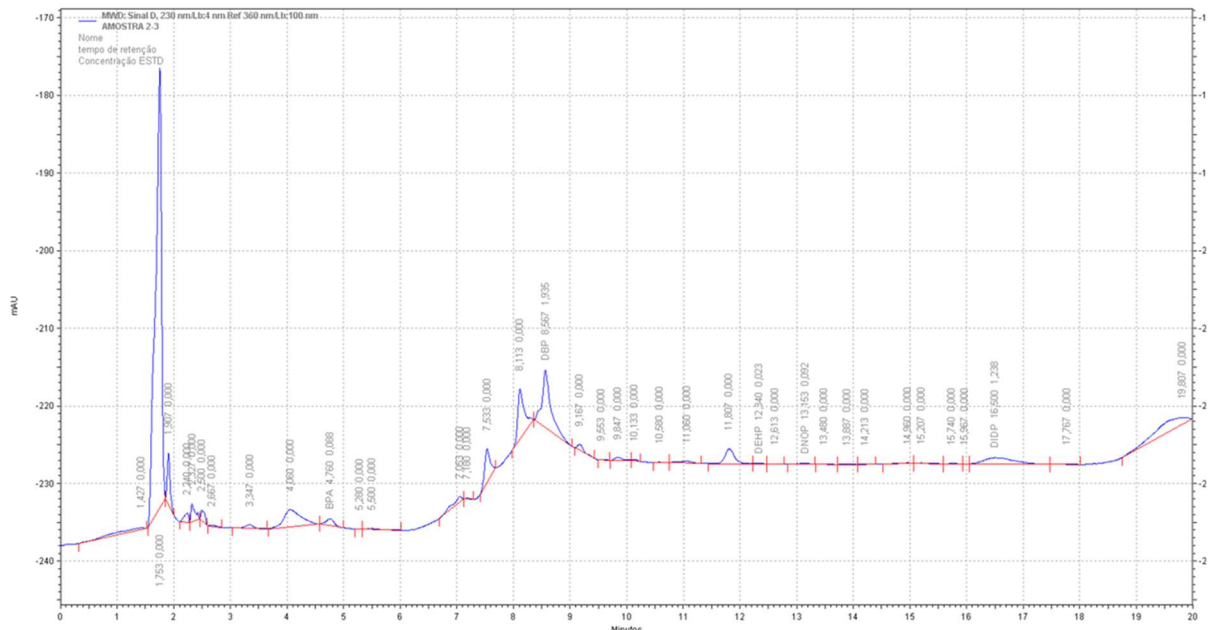
# ANEXOS

## Anexo 1 – Cromatograma da amostra 1



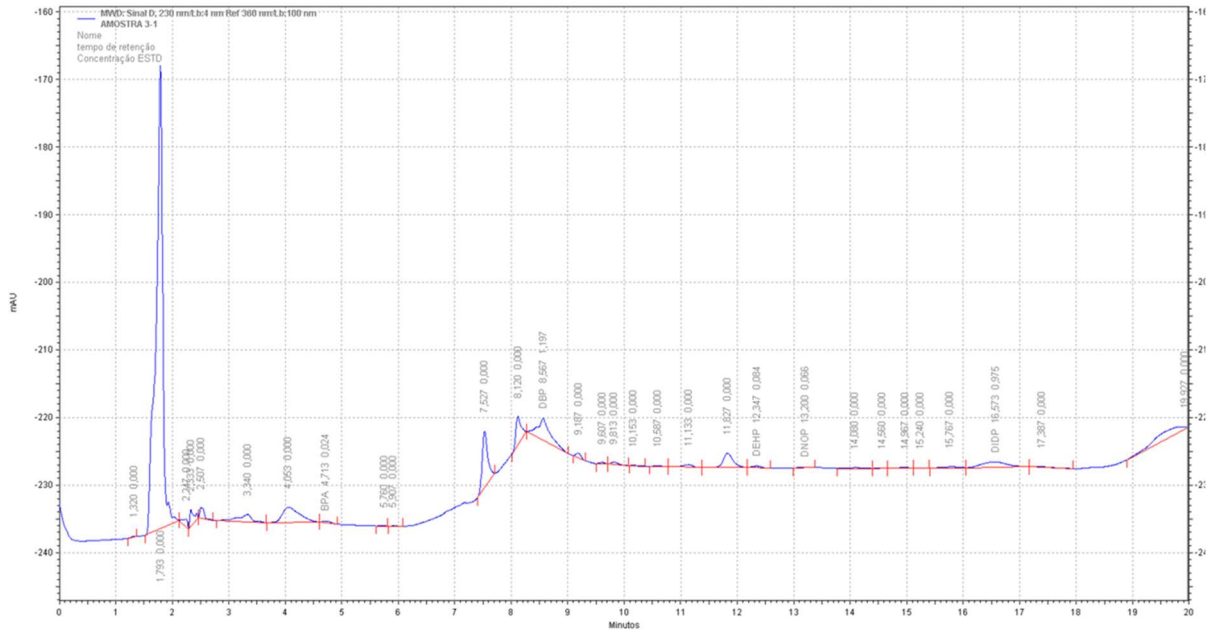
Fonte: Print screen do programa EZChrom Elite

## Anexo 2 – Cromatograma da amostra 2



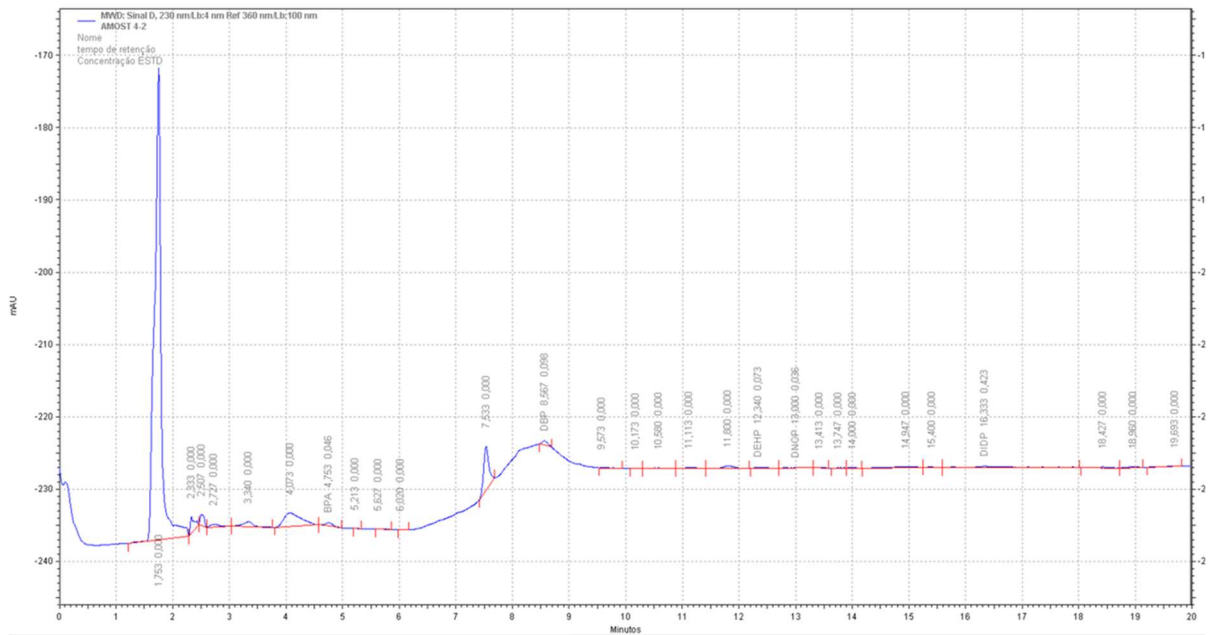
Fonte: Print screen do programa EZChrom Elite

### Anexo 3 – Cromatograma da amostra 3



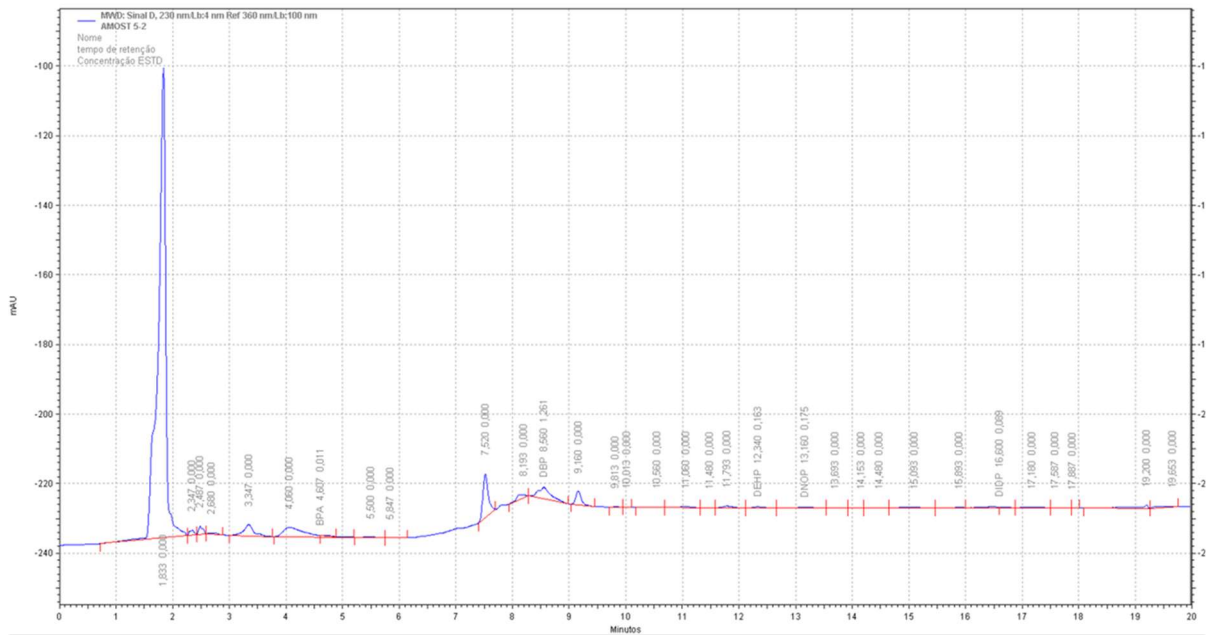
Fonte: Print screen do programa EZChrom Elite

### Anexo 4 – Cromatograma da amostra 4



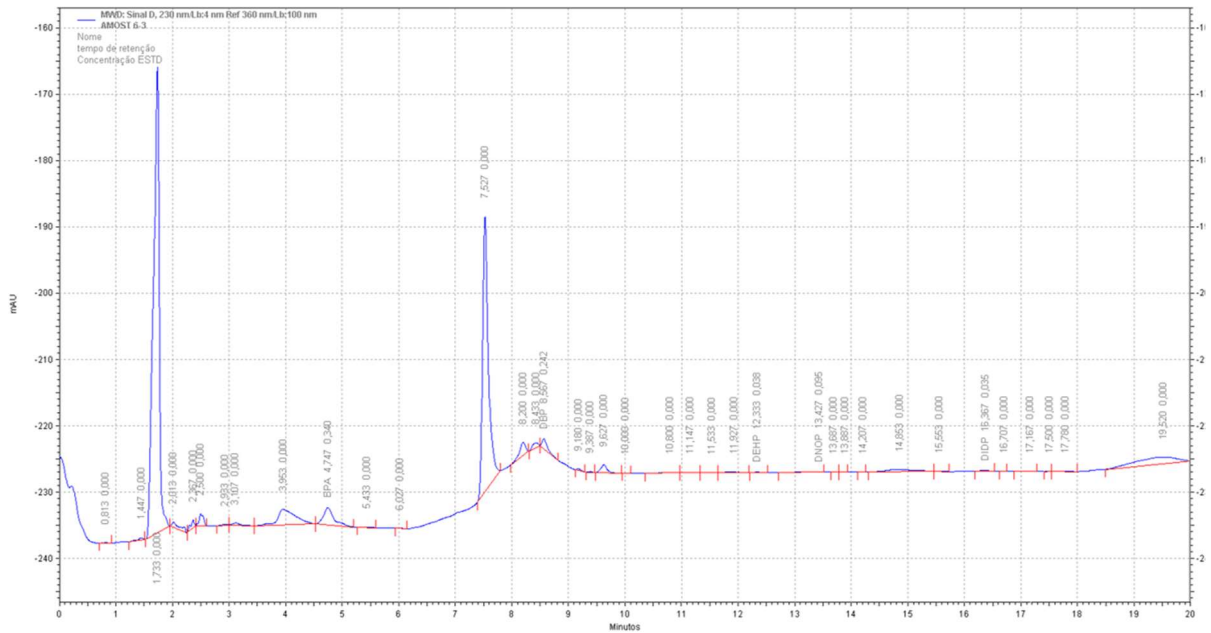
Fonte: Print screen do programa EZChrom Elite

### Anexo 5 – Cromatograma da amostra 5



Fonte: Print screen do programa EZChrom Elite

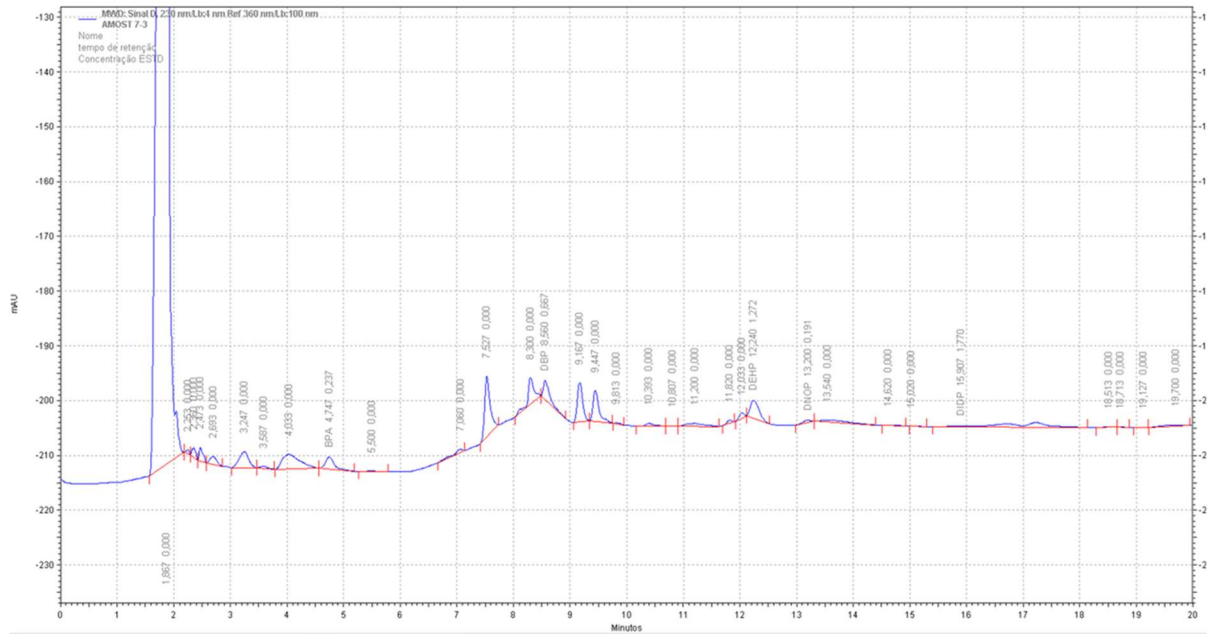
### Anexo 6 – Cromatograma da amostra 6



Fonte: Print screen do programa EZChrom Elite

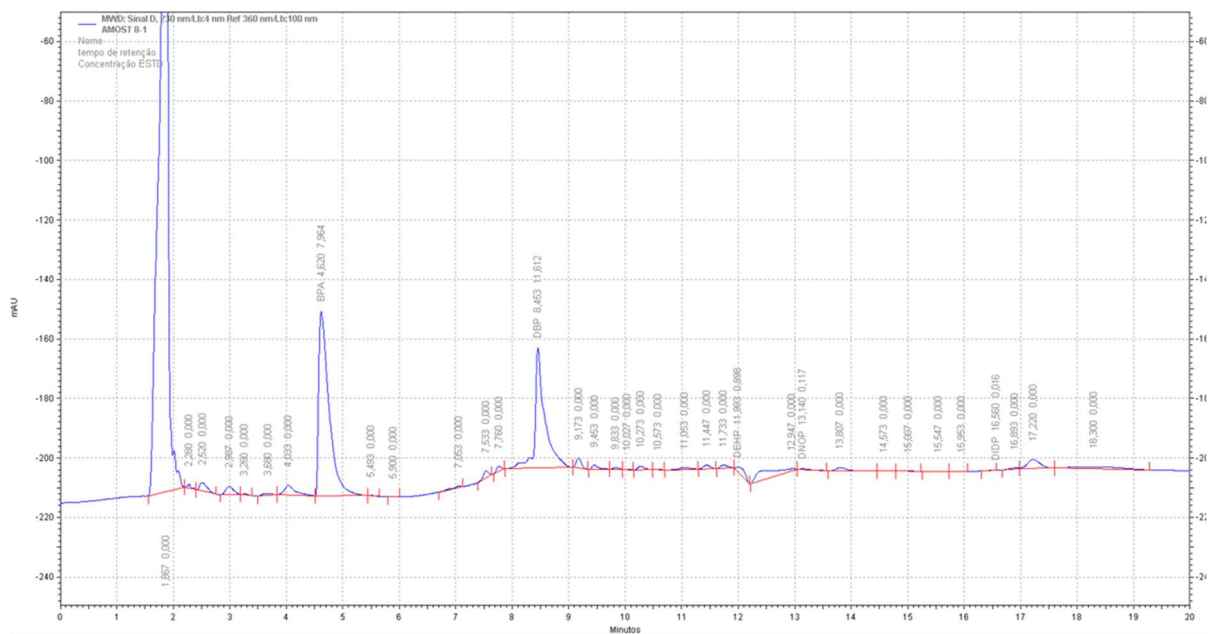


### Anexo 7 – Cromatograma da amostra 7



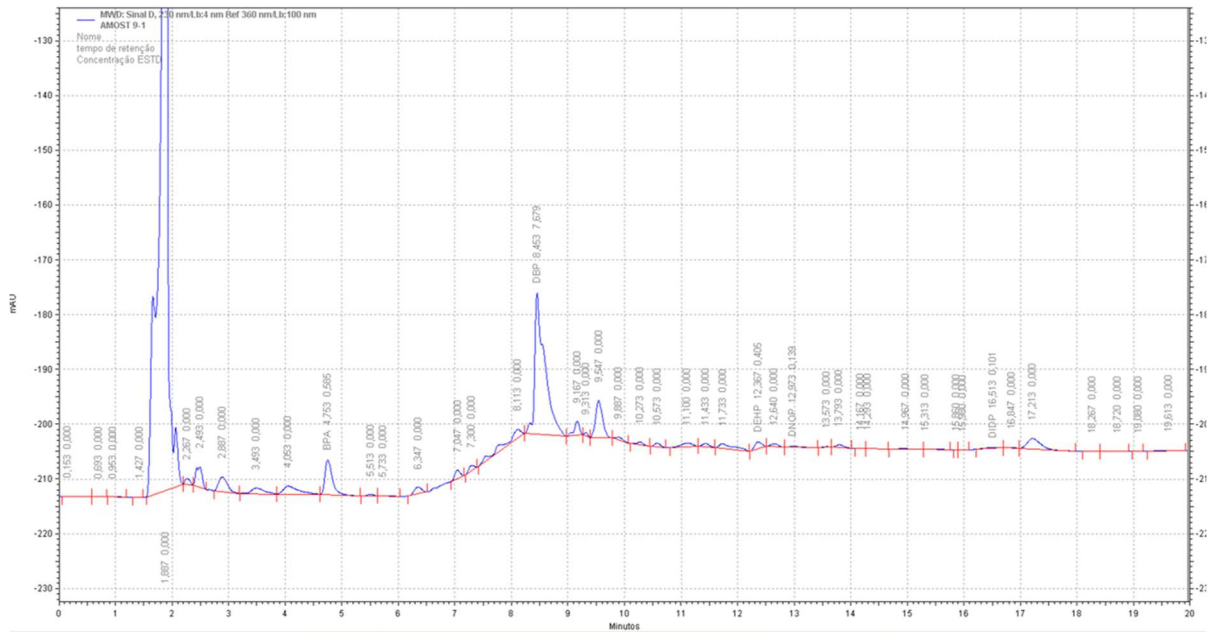
Fonte: *Print screen* do programa EZChrom Elite

### Anexo 8 – Cromatograma da amostra 8



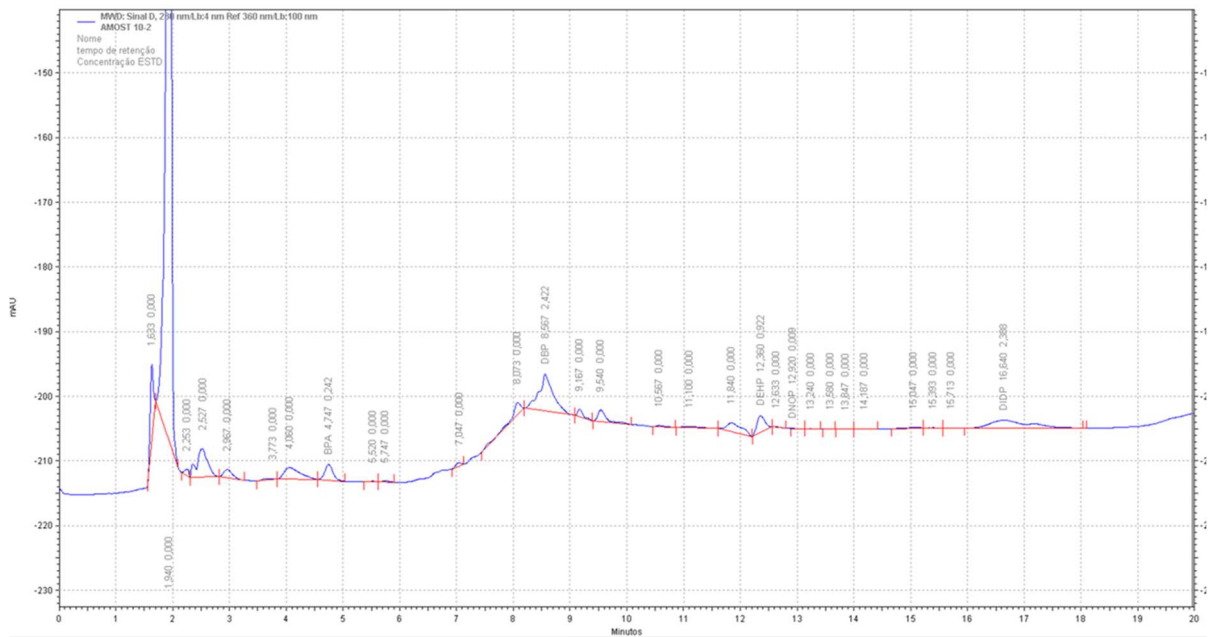
Fonte: *Print screen* do programa EZChrom Elite

### Anexo 9 – Cromatograma da amostra 9



Fonte: *Print screen* do programa EZChrom Elite

### Anexo 10 – Cromatograma da amostra 10



Fonte: *Print screen* do programa EZChrom Elite