

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química

José Messias Gomes

**Estudo da migração de ftalatos e bisfenol A para a saliva em
procedimentos odontológicos**

Belo Horizonte
2020

UFMG/ICEx/DQ. 1426

D. 772^a

José Messias Gomes

**Estudo da migração de ftalatos e bisfenol A para a saliva em procedimentos
odontológicos**

Dissertação apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Química – Química Analítica.

Orientador: Prof. Helvécio Costa Menezes

Coorientador: Profa. Zenilda de Lourdes Cardeal

Belo Horizonte

2020

Ficha Catalográfica

G633e Gomes, José Messias
2020 Estudo da migração de ftalatos e bisfenol A para a
D saliva em procedimentos odontológicos [manuscrito] /
José Messias Gomes. 2020.
[xi], 55 f. : il.

Orientador: Helvécio Costa Menezes.

Coorientadora: Zenilda de Lourdes Cardeal.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Minas Gerais - Departamento de Química.

Inclui bibliografia.

1. Química analítica - Teses. 2. Materiais biomédicos - Aspectos endócrinos - Teses. 3. Saliva - Exame - Teses. 4. Preparação de amostra (Química) - Teses. 5. Tratamento dentário - Teses. 6. Cromatografia de gás - Teses. 7. Espectrometria de massa - Teses. 8. Análise de componentes principais - Teses. 9. Análise de variância - Teses. I. Menezes, Helvécio Costa, Orientador. II. Cardeal, Zenilda de Lourdes, Coorientadora. III. Título.

CDU 043



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



""Estudo da Migração de Ftalatos e Bisfenol A para a Saliva em Procedimentos Odontológicos""

José Messias Gomes

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Helvécio Costa Menezes - Orientador
UFMG

Profa. Zenilda de Lourdes Cardeal - Coorientadora
UFMG

Prof. Rodinei Augusti
UFMG

Profa. Soraia Macari
UFMG

Belo Horizonte, 04 de dezembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Zenilda de Lourdes Cardeal, Coordenador(a)**, em 04/12/2020, às 18:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do



[Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.](#)



Documento assinado eletronicamente por **Rodinei Augusti, Professor do Magistério Superior**, em 04/12/2020, às 18:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.](#)



Documento assinado eletronicamente por **Helvecio Costa Menezes, Professor do Magistério Superior**, em 04/12/2020, às 18:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.](#)



Documento assinado eletronicamente por **Soraia Macari, Professora do Magistério Superior**, em 07/12/2020, às 22:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.](#)



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0450784** e o código CRC **DB15E735**.

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus pela força e sustento nos diversos momentos da minha vida e durante a realização desse projeto. “Para tudo há um tempo, para cada coisa há um momento debaixo do céu” Ecl 3:1

Agradeço à minha família pelo apoio e orações, em especial meu pai, minha mãe, meus irmãos por estarem sempre ao meu lado.

À minha esposa, Sabrina, pelo incentivo, paciência e por ser minha fortaleza nos momentos difíceis.

Aos meus orientadores Dr. Helvécio Costa Menezes e Dra. Zenilda de Lourdes Cardeal pela orientação, incentivo e pelos conhecimentos adquiridos ao longo desses dois anos.

À Dra. Soraia Macari, Dra. Monica Yamauti, Dra. Tarcília da Silva, a Tatiana Fernandes e ao Gabriel Antônio dos Anjos da Faculdades de Odontologia da UFMG pelas amostras concedidas.

Aos companheiros do laboratório RMCA pela convivência diária e pelo auxílio em diversos momentos.

Agradeço agências de fomentos CNPQ, CAPES e FAPEMIG pelo auxílio financeiro.

À UFMG e ao Departamento de Química pela infraestrutura.

RESUMO

Ftalatos e bisfenol A são desreguladores endócrinos (Des) amplamente utilizados como plastificantes em diversos produtos, incluindo materiais empregados em procedimentos odontológicos. A exposição a esses compostos está associada a disfunções no sistema endócrino mesmo em concentrações baixas. Técnicas analíticas têm sido desenvolvidas e aplicadas para avaliação da migração dos Des de diversos materiais. Neste trabalho foi utilizada a microextração em fase líquida com fibra oca (*Hollow Fiber Liquid-Phase Microextraction – HF-LPME*) para extração de dimetil ftalato (DMP), dietil ftalato (DEP), dibutil ftalato (DBP), diisobutil ftalato (DiBP), Di(2-etilhexil) ftalato (DEHP) e bisfenol A (BPA) em amostras de saliva humana com determinação por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS). Para analisar o BPA pela técnica de GC/MS foi necessário derivatizar as amostras com BSTFA. A otimização da etapa de extração utilizou três solventes: octanol, octanoato de etila e uma mistura desses solventes na proporção 1:1 v/v. A mistura de solventes apresentou melhor desempenho na extração dos analitos. Foi avaliado também o efeito do pH da fase doadora na extração dos analitos. O pH influenciou a extração do DMP e DEHP, que apresentou maior eficiência em meio neutro. O método empregado para a análise de ftalatos e BPA em saliva foi validado em saliva artificial e apresentaram bons resultados de seletividade, linearidade ($R^2 > 0,95$), baixos limites de detecção ($0,36\text{--}1,97 \mu\text{g L}^{-1}$) e quantificação ($0,66\text{--}6,56 \mu\text{g L}^{-1}$). A recuperação variou entre 80 e 125 % enquanto a variação no enriquecimento foi entre 480 e 750%. Esse método foi aplicado na análise de sessenta amostras de saliva coletadas de vinte crianças que passaram por procedimentos odontológicos para a correção de mordida aberta. As amostras foram coletadas em três tempos, antes do procedimento odontológico, trinta minutos e vinte e quatro horas após o procedimento odontológico. Os analitos DMP e DEP não foram detectados em nenhuma das amostras analisadas. DiBP e BPA apresentaram maior concentração trinta minutos após os procedimentos odontológicos. A análise de componentes principais (PCA) das amostras de saliva foi realizada e observou-se a formação dois agrupamentos (A e B) com separação em PC2, ambos os grupos contêm amostras coletadas em todos os tempos. Os resultados mostram que DBP e DiBP estão em maior concentração no grupo A, enquanto o BPA está em concentração menores nas amostras que formam o grupo B. A análise de variância ANOVA revelou diferenças

significativas nas médias de concentração de DiBP e BPA para os diferentes tempos estudados. Para o DiBP, diferenças significativas na concentração foram encontradas em amostras coletadas antes e trinta minutos após o procedimento odontológico. E para BPA essas diferenças foram encontradas em amostras coletadas trinta minutos e vinte quatro horas após o tratamento. Com base nas concentrações determinadas nesse estudo, foi possível estimar o Consumo Diário (ECD) de cada analito e comparar com a ingestão diária tolerável (*Tolerable Daily Intake* - TDI) determinada pela Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (*European Food Safety Authority* – EFSA). Para todos os analitos os valores de ECD estavam abaixo dos valores de TDI, indicando que a migração desses compostos estavam em níveis aceitáveis segundo a EFSA. Os resultados obtidos permitem concluir que o método HF-LPME-GC/MS utilizado foi adequado para avaliar a migração de ftalatos e BPA de materiais odontológicos para saliva. O método HF-LPME aplicado à saliva, além de não invasivo é praticamente livre de solvente, o que reduz o custo de extração quando comparado com técnicas tradicionais. Como perspectiva este método poderá ter seu escopo ampliado para biomonitorar outras classes de compostos tóxicos na saliva.

Palavrachave: Desreguladores Endócrinos, HF-LPME, ftalatos, bisfenol A, Bisfenol Glicidilmetacrilato, saliva, Materiais Biomédicos e Odontológicos.

ABSTRACT

Phthalates and bisphenol A are Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs) widely used as plasticizers in several products, including materials used in dental procedures. Exposure to these compounds is associated with dysfunctions in the endocrine system even at low concentrations. Analytical techniques have been developed and applied to evaluate the migration of EDCs from different materials. Hollow Fiber Liquid-Phase Microextraction (HF-LPME) was used in this study to extract dimethyl phthalate (DMP), diethyl phthalate (DEP), dibutyl phthalate (DBP), diisobutyl phthalate (DiBP), Di (2-Ethylhexyl) phthalate (DEHP) and bisphenol A (BPA) from human saliva samples. Their concentrations were obtained using gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS). To analyze BPA using the GC/MS technique, it was necessary to derivatize the samples with BSTFA. The optimization of the extraction step was evaluated with three solvents: octanol, ethyl octanoate and a mixture of these solvents in a 1:1 v/v ratio. The solvent mixture showed better performance in extracting the analytes. The effect of the pH of the donor phase on the extraction of the analytes was also evaluated. The pH influenced the extraction of DMP and DEHP, which showed greater efficiency in neutral medium. The method used for the analysis of phthalates and BPA in saliva was validated in artificial saliva and presented good results of selectivity, linearity ($R^2 > 0.95$), low detection limits ($0.36\text{--}1.97 \mu\text{g L}^{-1}$) and quantification ($0.66\text{--}6.56 \mu\text{g L}^{-1}$). The recovery varied between 80 and 125% while the variation in enrichment was between 480 and 750%. This method was applied to the analysis of sixty saliva samples collected from twenty children who underwent dental procedures to correct open bite. The samples were collected in three stages, before the dental procedure, thirty minutes and twenty-four hours after the dental procedure. DMP and DEP analytes were not detected in any of the analyzed samples. DiBP and BPA had a higher concentration thirty minutes after dental procedures. The Principal Component Analysis (PCA) of the saliva samples was performed and the formation of two clusters (A and B) with separation in PC2 was observed, both groups contain samples collected at all times. The results show that DBP and DiBP are in higher concentration in group A, while BPA is in lower concentration in the samples that form group B. The analysis of variance (ANOVA) revealed significant differences in the average concentration of DiBP and BPA for different times studied. For DiBP, significant differences in the

concentration of this compound were found in samples collected before and thirty minutes after the dental procedure. And for BPA, these differences were found in samples collected thirty minutes and twenty-four hours after treatment. Based on the concentrations determined in that study, it was possible to Estimate the Daily Consumption (EDC) of each analyte and compare it with the tolerable daily intake (Tolerable Daily Intake - TDI) determined by the European Food Safety Authority (EFSA). For all analytes, the ECD values were below the TDI values, indicating that the migration of these compounds was at acceptable levels according to EFSA. The results obtained allow us to conclude that the HF-LPME-GC / MS method used was adequate to evaluate the migration of phthalates and BPA from dental materials to saliva. The HF-LPME method applied to saliva, in addition to being non-invasive, is practically solvent-free, which reduces the cost of extraction when compared to traditional techniques. As a perspective, this method may have its scope expanded to biomonitor other classes of toxic compounds in saliva.

Keyword: Endocrine disrupting chemicals, HF-LPME, phthalates, bisphenol A, saliva, dental materials

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura dos monômeros comumente empregados em resinas. Bis-GMA (Bisfenol Glicidilmetacrilato), TEGDMA (Trietilenoglicol Dimetacrilato), HEMA (Hidroxietyl Metacrilato) e UDMA (Uretano Dimetacrilato). (Fonte: Sampaolese et al., 2011).....	4
Figura 2 – Reação entre anidrido ftálico e álcool para a formação do éster ftálico(A). Estrutura dos ftalatos analisados nesse trabalho (B).Adaptado de Katsikantami et al., 2016.....	7
Figura 3 – Reação de sínteses do BPA (Adaptado de: Bernardo et al., 2015). ...	9
Figura 4 - Membrana de polipropileno usada na HF-LPME.....	14
Figura 5 - Representação esquemática da microextração em fase líquida utilizando fibra oca com configuração (A) em U; (B) em haste. Adaptado de Oliveira et al., (2008).....	15
Figura 6 - Modos de extração utilizado na microextração em fase líquida suportada com fibra oca (HF-LPME): três fases (A) e duas fases (B).....	16
Figura 7 - Sistema de extração HF-LPME composto pelo frasco de extração contendo uma barra magnética para agitação, a amostra com os analitos e uma fibra de polipropileno de 600 µm de diâmetro interno, 0,2 µm de tamanho de poros e 200 µm de parede com 70% de porosidade, cortada no comprimento de 7,0 cm e suportada em duas agulhas de seringa hipodérmica.....	24
Figura 8 - Reação geral de formação de um derivado sililado. (Farajzadeh et al., 2014).....	25
Figura 9 – Possíveis estruturas de fragmentação dos compostos estudados	26
Figura 10 - Comparação entre as áreas cromatográficas obtidas por GC/MS após a extração de BPA e ftalatos de uma solução aquosa de 50 µg L ⁻¹ (n=3) utilizando diferentes solventes e derivatização com BSTFA. As áreas foram calculadas utilizando cromatograma de íon extraído (EIC) para cada composto.	28

Figura 11 - Comparação entre os pH para extração dos analitos em meio ácido (pH =2), neutro(pH=7) e básico(pH=10), utilizando como solvente extrator a mistura de octanoato de etila e octanol (50 % v/v) e tempo de extração de 55 min. As áreas foram obtidas utilizando por de íon extraído (EIC). 30

Figura 12 - Cromatogramas de íon extraído (EIC) obtido por GC/MS de uma amostra de branco (A) e de uma solução padrão de ftalatos e BPA em saliva artificial na concentração de 150 µg L⁻¹. Ambos EIC foram obtidos após extração com uma mistura de octanoato de etila e octanol (50% v/v) e após a derivatização com BSTFA contendo 1% de TMCS (1 - DMP; 2 - DEP; 3 - DiBP; 4 - DBP; 5 - BPA; 6 – DEHP). 32

Figura 13 - Relação entre as concentrações de DiBP, DBP e BPA antes do procedimento odontológico, trinta minutos e vinte quatro horas após o procedimento odontológico. 38

Figura 14 - Média e comparação entre as médias utilizando o teste de Tukey para DiBP (superior) e BPA (inferior) para amostras de salivas coletadas antes do procedimento odontológico, trinta minutos e vinte quatro horas após a realização do procedimento odontológico. 39

Figura 15 - Gráfico de scores e de loading dos tempos estudados: Antes do procedimento odontológico (vermelho), 30 minutos (preto) e 24 horas depois do procedimento odontológico (azul)..... 40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas dos compostos estudados. Fonte: adaptado de Wittassek and Angerer, 2008.	8
Tabela 2 – Metodologias de extração e análise de ftalatos, metabólitos de ftalatos e bisfenol A.	13
Tabela 3 - Médias das áreas obtidas para DMP, DiBP e DBP que exibiram diferenças significativa nos solventes avaliados como solventes de extração.	29
Tabela 4 - Áreas obtidas para os analitos nos valores de pH analisados.	31
Tabela 5 - Faixa linear, equação do modelo, coeficiente de determinação, limites de detecção e quantificação do método HF-LPME-GC/MS.	34
Tabela 6 – Cálculo da recuperação, fator de enriquecimento teórico e precisão intra e inter-dia para o método HF-LPME-GC/MS aplicado a saliva artificial.	34
Tabela 7 - Concentração dos ftalatos e bisfenol A nas amostras de saliva coletadas antes do procedimento odontológico, 30 minutos e 24 horas após o procedimento odontológico.	36
Tabela 8 - Valores estimados de consumo diário (ECD) para os ftalatos e BPA detectados nesses estudos.	42

LISTA DE ABREVIADURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BzBP	Butilbenzil ftalato
Bis-GMA	Bisfenol Glicidilmetacrilato
BP	Benzofenona
BPA	Bisfenol A
BzBP	Benzil butil ftalato
DBP	Dibutil ftalato
DCHP	Diciclohexil ftalato
DEHP	Di(2-etilhexil) ftalato
DEP	Dietil ftalato
Des	Desreguladores endócrinos
DiBP	Diisobutil ftalato
DiDP	Diisodecil ftalato
DiNP	Diisononil ftalato
DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva (<i>Dispersive Liquid-Liquid Microextraction</i>)
DMEP	Bis(2-metoxetila) ftalato
DMP	Dimetil ftalato
DnOP	Di-n-octil ftalato
DnPP	Di-n-pentil ftalato
DOP	Dioctil ftalato
EDC	<i>Endocrine Disrupting Chemical</i>
EFSA	Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (<i>European Food Safety Authority</i>)
GC/MS	cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (<i>Gas Chromatography Mass Spectrometry</i>)
HEMA	Hidroxietil Metacrilato
HF-LPME	Microextração em fase líquida suportada em fibra oca (<i>Hollow Fiber Liquid-Phase Microextraction</i>)
HMW	Alta massa molecular (<i>High Molecular Weight</i>)
IBcEP	2-isobutil ciclohexil ftalato
LC/MS	Cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massas
LLE	Extração líquido-líquido (<i>Liquid-Liquid Extraction</i>)
LLME	Microextração líquido-líquido (<i>Liquid Liquid Microextraction</i>)
LME	Limite de Migração Específica
LMW	Baixa massa molecular (<i>Low Molecular Weight</i>)
MS	Espectrometria de massas
NP	Nonilfenol
NRs	Receptores nucleares (<i>Nuclear Receptors</i>)
OP	4-tert-ocilfenol
PC	Policarbonato
PCOS	Síndrome do ovário policístico
PEs	Ftalatos (<i>Phthalate Esters</i>)
PVC	Policloreto de vinila
SDME	Microextração em gota suspensa (<i>Single Drop Microextraction</i>)
SML	Limite de Migração Específica (<i>Specific Migration Limit</i>)
SPE	Extração em fase sólida (<i>Solid Phase Extraction</i>)
SPME	Microextração em fase sólida (<i>Solid Phase Microextraction</i>)
TDI	Ingestão Diária Tolerável (<i>Tolerable Daily Intake</i>)
TEGDMA	Trietilenoglicol Dimetacrilato
UDMA	Uretano Dimetacrilato
UPLC/MS	Cromatografia líquida de ultra-alto desempenho acoplada com espectrometria de massas
UVALLME	Microextração líquido-líquida assistida por vórtice ultrassônico (<i>Ultrasound Vortex Assisted Liquid Liquid Microextraction</i>)

Conteúdo

AGRADECIMENTO	i
RESUMO.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ABREVIADURAS E SIGLAS	ix
1 Introdução.....	1
2 Objetivos	3
3 Revisão bibliográfica.....	4
3.1 Materiais Odontológicos.....	4
3.2 Desreguladores endócrinos	5
3.2.1 Ftalatos.....	6
3.2.2 Bisfenol – A.....	9
3.2.3 Efeitos endógenos e exógenos	10
3.3 Limites e legislação	11
3.4 Metodologias de extração e análises.....	12
3.5 Microextração em fase líquida suportada em fibra oca (HF-LPME) ...	13
3.5.1 Fundamentação teórica	16
3.5.2 Características determinantes para HF-LPME	18
4 Determinação de ftalatos e bisfenol – A em saliva	20
4.1 Materiais e métodos	20
4.1.1 Materiais e equipamentos	20
4.1.2 Preparo das vidrarias.....	21
4.1.3 Padrões e soluções	22
4.1.4 Preparo de amostras de saliva.....	22
4.1.5 Método de extração HF-LPME	23

4.1.6	Derivatização	24
4.1.7	Análise cromatográfica	25
4.1.8	Parâmetros de mérito	27
4.2	Resultados e discussões	28
4.2.1	Método de extração HF-LPME	28
4.2.2	Parâmetros de mérito	31
4.2.3	Linearidade, LOD e LOQ	33
4.2.4	Aplicação em amostras reais.....	35
5	Conclusão	42
6	Referências	43

1 Introdução

Diariamente milhares de toneladas de plásticos são produzidos para atender os mais diversos propósitos (Geyer et al., 2017). Materiais plásticos são utilizados na produção de sacolas, embalagens de alimentos, brinquedos, partes de automóveis, materiais médicos e de construção entre outros (Halden, 2010). Enquanto são inegáveis os benefícios obtidos pelo uso de plástico, efeitos adversos causados na saúde e no meio ambiente também não podem ser negligenciados.

Recentemente, grande interesse tem sido demonstrado no estudo de substâncias com propriedades de interferir no sistema endócrino humano e de outros animais. Essas propriedades são intrínsecas de substâncias conhecidas como desreguladores endócrinos (Des). Essas substâncias podem causar danos à saúde, ao crescimento e à reprodução dos organismos expostos a elas (Konieczna et al., 2015; Ribeiro et al., 2017).

Ftalatos e o bisfenol A, empregados na fabricação de diversos materiais, são classificados como desreguladores endócrinos e apesar da sua atividade hormonal comprovada, são amplamente utilizados em diversos materiais empregados na indústria, agricultura, medicina e nos lares de milhares de pessoas (Vandenberg et al., 2007; Wittassek and Angerer, 2008).

O 4,4'-dihidroxi-2,2-difenilpropano ou comumente conhecido bisfenol A (BPA) é um monômero empregado na produção de uma série de produtos, desde artigos plásticos feitos à base de policarbonato passando por resinas epóxi, papel térmico, isolante térmico, adesivos, recipientes de armazenamento de alimento, tubulações e materiais odontológicos (resinas de restaurações, adesivos para a fixação de próteses entre outros) (Abraham and Chakraborty, 2019). Anualmente são produzidas milhares de toneladas dessa substância, empregada na confecção de centenas de produtos (Akash et al., 2020).

Os ftalatos, diferentemente do BPA, são plastificantes adicionados aos materiais para aumentar a flexibilidade (Bodaghi, 2019). Ftalatos são produzidas a partir do anidrido ftálico e empregados em diversos produtos, uma vez que flexibilidade é uma característica importante em materiais poliméricos. Ademais, ftalatos podem ser

utilizados como solventes e propelentes em cosméticos e aerossóis (Fernández et al., 2006; Heise and Litz, 2004).

A problemática envolvendo o uso desses compostos advém da combinação da ubiquidade de ftalatos e BPA, e da capacidade de atuarem como desreguladores endócrinos. Processos físico-químicos são os principais responsáveis pela exposição humana e ambiental a esses compostos. Variação de temperatura, pH, teor de gordura e exposição à radiação solar, são alguns exemplos de processos que podem levar a liberação dessas substâncias da matriz polimérica (Fasano and Cirillo, 2018; Galloway et al., 2019). Uma vez liberados, ftalatos e BPA podem causar danos importantes ao organismo.

Estudos recentes apontam associação de BPA com síndromes do ovário policístico (Akgül et al., 2019). Em outro estudo, Grohs et al. (2019), sugerem que há uma correlação entre a exposição materna a BPA e a redução de substância branca no cérebro de crianças (Grohs et al., 2019). A exposição à BPA também pode estar associado a problemas na ação hormonal da tireoide (Kim and Park, 2019), câncer de próstata (Wetherill et al., 2005) e diabetes (Akash et al., 2020).

Assim como BPA, ftalatos também estão associados a problemas metabólicos como resistência à insulina (Shoshtari-Yeganeh et al., 2019) e diabetes (Shoshtari-Yeganeh et al., 2019), infertilidade (Tranfo et al., 2012) e câncer (Zuccarello et al., 2018). Zhu et al., (2018), investigaram a ação de ftalatos na proliferação de células cancerígenas. Em seus estudos foi demonstrado que DEHP(Di(2-etilhexil) ftalato), BzBP(Butil benzil ftalato), e DBP(Dibutil ftalato) podem promover a proliferação de células cancerígenas (Zhu et al., 2018).

A detecção e quantificação de ftalatos e BPA em matrizes como sangue, urina, saliva e alimentos demanda o emprego de técnicas de extração capazes de reduzir a quantidade de interferentes ao mesmo tempo em que concentra os analitos, que muitas vezes estão presentes em quantidade muito baixa (Tsochatzis et al., 2017). Nesse contexto, técnicas de extração miniaturizadas como a microextração em fase líquida suportada com fibra oca (*Hollow Fiber Liquid-Phase Microextraction HF-LPME*) tem ganhado destaque. Nessa técnica, a extração e concentração de analitos ocorrem em

uma única etapa com parâmetros de recuperação e enriquecimento elevados (Venson et al., 2019).

A técnica de HF-LPME é a miniaturização da técnica convencional de extração líquido-líquido (*Liquid - Liquid Extraction LLE*), portanto ela utiliza uma quantidade menor de solvente orgânico e apresenta ainda alta seletividade e recuperação. Em HF-LPME a fase aceptora é introduzida no interior de uma fibra de polipropileno e a transferência dos analitos da matriz aquosa (fase doadora) ocorre pela parede porosa da fibra de polipropileno. O processo de transferência dos analitos é resultado da diferença de solubilidade desses compostos nas fases doadora e aceptora (Pedersen-Bjergaard and Rasmussen, 2008).

Neste trabalho, o método desenvolvido anteriormente por Cerqueira (2018) foi modificado e aplicado na determinação de migração de ftalatos e bisfenol A em saliva de crianças que passaram por procedimento odontológico para a correção de mordida aberta anterior. O método utilizado empregou a técnica de extração HF-LPME e a concentração dos analitos foram determinadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (*Gas Chromatography Mass Spectrometry GC/MS*).

2 Objetivos

Aperfeiçoar, validar e aplicar método de extração e análise de ftalatos e BPA em saliva coletada após procedimentos odontológicos.

Objetivos específicos:

- Aperfeiçoar a extração de ftalatos e BPA de amostras de saliva utilizando a HF-LPME;
- Aperfeiçoar método de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS) para determinação dos ftalatos e BPA em amostras de saliva artificial;
- Aplicar o método HF-LPME-GC/MS validado para análise de ftalatos e BPA em amostras de saliva coletadas de pacientes que passaram por tratamentos odontológicos;

3 Revisão bibliográfica

3.1 Materiais Odontológicos

Diversos materiais são utilizados em tratamentos dentários, dentre esses estão resinas, adesivos e próteses. Estes materiais são utilizados em procedimentos clínicos, tais como mudança na forma do dente, recuperação de fraturas, preenchimento de cavidades, correções de imperfeições entre outros (Pratap et al., 2019).

Os monômeros comumente empregados em resinas são Bis-GMA (bisfenol glicidilmetacrilato), TEGDMA (trietilenoglicol dimetacrilato), UDMA (uretano dimetacrilato) e HEMA (hidroxietil metacrilato) (Figura 1). Cada um apresenta propriedades físicas e químicas que influenciam não somente a qualidade e custo da resina, mas também o processo de polimerização. Este processo é extremamente importante para a biocompatibilidade do material. Quanto mais eficiente o processo de polimerização menor a possibilidade de liberação de monômeros livres na cavidade oral (Bationo et al., 2016; Geens et al., 2011; Pratap et al., 2019).

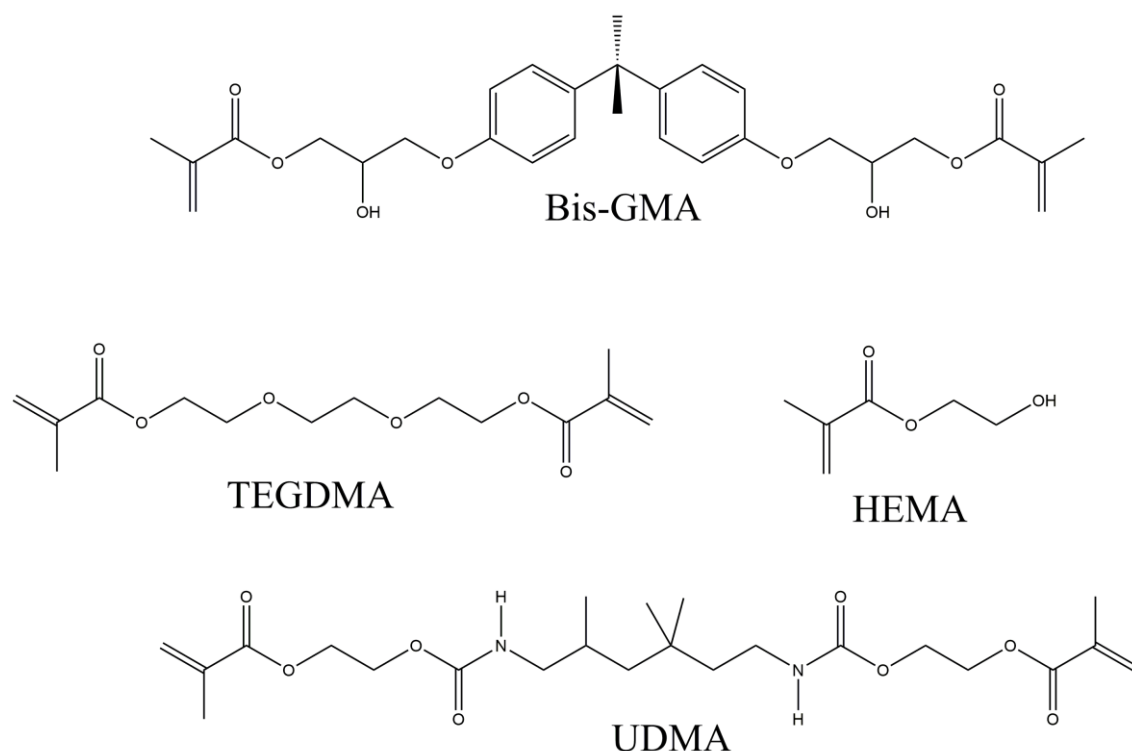


Figura 1 – Estrutura dos monômeros comumente empregados em resinas. Bis-GMA (Bisfenol Glicidilmetacrilato), TEGDMA (Trietilenoglicol Dimetacrilato), HEMA (Hidroxietil Metacrilato) e UDMA (Uretano Dimetacrilato). (Fonte: Sampaolese et al., 2011).

Embora a eficiência do processo de polimerização seja importante, a liberação de monômeros também está associado às constantes variações que ocorrem no ambiente oral, principalmente pH e temperatura. Essas variações podem levar a liberação de monômeros não polimerizados da resina que podem interagir com receptores celulares causando quadros de infecções, inflamações e reações alérgicas, além de mutagênicas na cavidade oral e em outros tecidos que absorvam essas substâncias (Halden, 2010; Rogers et al., 2013).

De acordo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas (IBGE), em 2013 foram 89,1 milhões de brasileiros que realizaram algum procedimento dentário o que equivalia a 44,4% da população nacional, dos quais 45,2 % pertenciam a faixa etária de 0 a 17 anos de idade (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2015).

3.2 Desreguladores endócrinos

Desreguladores endócrinos (Des) podem ser definidos como substâncias exógenas, naturais ou sintéticas, com capacidade de interferir na produção, liberação, transporte, metabolismo, ação ou eliminação de hormônios naturais (Baird, 2012; Ribeiro et al., 2017). A interferência causada por esse composto compromete o sistema endócrino e pode causar problemas graves de saúde, como por exemplo, diabetes (Emfietzoglou et al., 2019; A. J. Li et al., 2019; Wade et al., 2020), obesidade (Akash et al., 2020; Hatch et al., 2010; Radke et al., 2019), câncer (Shafei et al., 2018; Tarapore et al., 2014; Wetherill et al., 2005; Zuccarello et al., 2018) e infertilidade (Akgül et al., 2019; Casals-Casas and Desvergne, 2011; Wang et al., 2016).

Todo o potencial problema causado por Des decorre da sensibilidade do sistema endócrino a esses compostos. Esse sistema é composto por várias glândulas que secretam hormônios na corrente sanguínea. Estes são responsáveis pela manutenção do metabolismo, sínteses de substâncias importantes para o crescimento e desenvolvimento do sistema reprodutor e sexual, entre outras funções (Ribeiro et al., 2017).

Compostos que apresentam propriedades de interferir no sistema endócrino podem ser separados em dois tipos. Desreguladores endócrinos naturais, compostos originados de fontes naturais como animais e plantas, como é o caso dos fitoestrogênios. E desreguladores endócrinos de origem sintética, ou seja, aqueles produzidos para

atender demandas comerciais ou poluentes gerados nos diversos processos industriais e de obtenção de energia (Baird, 2012; Casals-Casas and Desvergne, 2011)

Apesar de ambas as fontes de Des serem importantes, um foco especial é dado aos de origem sintética. Isso porque estes são produzidos em grande quantidade, o que aumenta a possibilidade de exposição humana e ambiental (Casals-Casas and Desvergne, 2011; Ribeiro et al., 2017). Esta classe é representada por diversos compostos incluindo pesticidas, compostos utilizados na fabricação de plásticos, poluentes e outros rejeitos da indústria química (Casals-Casas and Desvergne, 2011).

Embora muitas substâncias químicas tenham capacidade interferir no sistema endócrino, o mecanismo de ação desses compostos é geralmente similar. Uma vez que esses compostos têm forma análoga a hormônios naturais, a maioria dos Des se liga aos receptores de estrogênio. No entanto essa ligação é mais fraca que a ligação do receptor com o hormônio natural (Baird, 2012).

Ainda que a ligação entre Des e os receptores de estrogênio seja o mecanismo de ação mais comum desses compostos, outros receptores podem estar envolvidos como os receptores nucleares (Nuclear Receptors – NRs). Esses representam cerca de 48 tipos de receptores, dentre os quais estão esteroide sexuais e receptores responsáveis pelas regulação e modulação genética (Casals-Casas and Desvergne, 2011). A grande quantidade de NRs colabora para a associação de que desreguladores endócrinos podem causar problemas metabólicos e de desenvolvimento.

3.2.1 Ftalatos

Os ftalatos (*Phthalate Esters* – Pes) estão entre os compostos químicos mais utilizados pela indústria. Em 2006 sua produção foi superior a 210 mil toneladas (EPA, 2012). Estes compostos são obtidos pela reação do anidro ftálico com um álcool (Figura 2). Esta reação leva a produção dos ésteres de ácido ftálico, comumente chamados de ftalatos (Katsikantami et al., 2016).

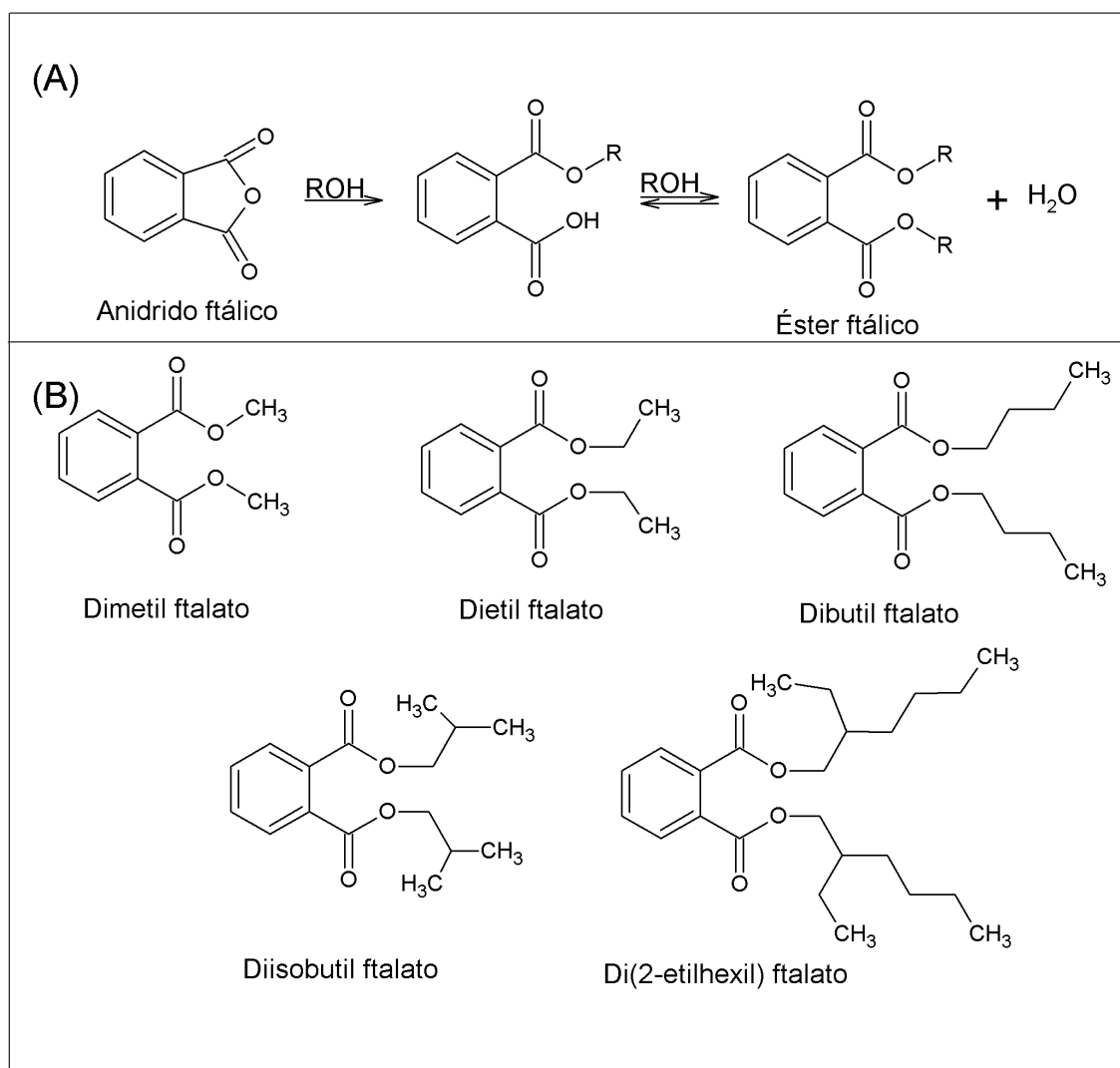


Figura 2 – Reação entre anidrido ftálico e álcool para a formação do éster ftálico(A). Estrutura dos ftalatos analisados nesse trabalho (B). Adaptado de Katsikantami et al., 2016.

Os ftalatos são empregados como plastificantes em materiais poliméricos, como no policloreto de vinila (PVC), e em tintas, adesivos, materiais médicos, cosméticos, embalagens de alimentos e produtos de higiene pessoal. Aproximadamente 65 % dos plastificantes utilizados nos diversos materiais são Pes (IHS Markit, 2018).

Plastificantes são compostos sólidos ou líquidos que apresentam baixa pressão de vapor, em sua maioria são ésteres. Eles são adicionados aos polímeros para aumentar a flexibilidade e são chamados de aditivos, pois são adicionados aos polímeros sintéticos para melhorar suas propriedades físico-químicas e estéticas (Bodaghi, 2019).

Ésteres de ácido ftálico com menos de 3 átomos de carbono nas cadeias laterais, dimetil ftalato (DMP) e dietil ftalato (DEP), podem ser empregados ainda como solventes, fixadores de fragrâncias e aditivos em produtos de higiene pessoal e de beleza (Fisher et al., 2019; Heise and Litz, 2004; Koppen et al., 2019; H. L. Li et al., 2019; Wittassek and Angerer, 2008). A Tabela 1 apresenta as propriedades físico-químicas dos ftalatos estudados nesse trabalho.

Esses compostos ao interagirem com os plásticos não reagem quimicamente com a matriz polimérica, o que resulta na formação de interações fracas que podem ser rompidas ao longo do tempo, causando a migração dos Pes da matriz polimérica para o meio exterior (Bodaghi, 2019).

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas dos compostos estudados. Fonte: adaptado de Wittassek and Angerer, 2008.

Composto	Abreviação	Fórmula molecular	CAS	Massa Molar (g mol⁻¹)	C^S_{WL a} (mg L⁻¹)	Log K_{OW}
Dimetil ftalato	DMP	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	131-11-3	194.2	5220	1.61
Dietil ftalato	DEP	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	84-66-2	222.2	591	2.54
Dibutil ftalato	DBP	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	84-74-2	278.4	9.9	4.27
Diisobutil ftalato	DiBP	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	84-69-5	278.4	9.9	4.27
Di(2-etilhexil) ftalato	DEHP	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	117-81-7	390.6	2.49x10 ⁻³	7.73

C^S_{WL a} (mg L⁻¹) – solubilidade do ftalato em água. K_{OW} – coeficiente de partição octanol-água.

3.2.2 Bisfenol – A

4,4'-dihidroxi-2,2-difenilpropano, também conhecido como bisfenol A (BPA) é produzido por uma reação de condensação entre fenol e acetona na presença de um catalizador ácido (Figura 3). Esse composto foi sintetizado primeiramente em 1891 por Aleksandr Dianin, mas suas propriedades e atividade estrogênica só foram estudadas anos mais tarde (Krishnan et al., 1993).

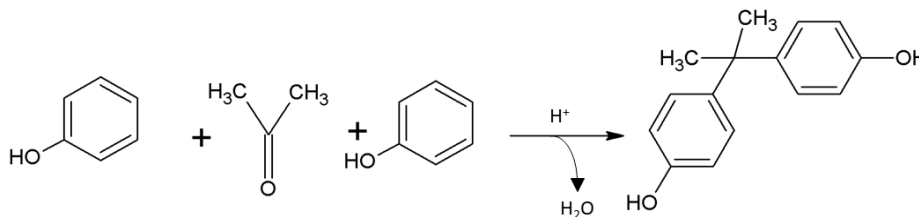


Figura 3 – Reação de sínteses do BPA (Adaptado de: Bernardo et al., 2015).

A produção mundial anual desse composto é superior a três milhões de toneladas (Akash et al., 2020). A grande produção e consumo de BPA está relacionada à sua utilização na fabricação de diversos produtos. A mais expressiva delas, é a fabricação de policarbonato (PC) para usos que variam da construção civil a produção de janelas de avião, passando por embalagens de alimentos e bebidas. Outra aplicação é na fabricação de resina epóxi que é utilizada no recobrimento interno e externo de latas de alimento. BPA é utilizado ainda na produção de papel térmico, retardante de chama e na produção de selantes e resinas dentárias (Bernardo et al., 2015; Flint et al., 2012; Mertens et al., 2016).

Apesar da diversidade de aplicações, o uso do BPA tem sido regulado em muitos países devido às incertezas em relação as suas propriedades estrogênicas e a associação entre BPA e diversas doenças (Akash et al., 2020; Ferguson et al., 2015).

A ampla utilização do BPA requer elevados níveis de produção, o que resulta em grande exposição ambiental, alimentar e ocupacional. Como consequência, o BPA pode ser encontrado na maioria dos organismos (Geens et al., 2012; Sun et al., 2014). Esse fato juntamente com a capacidade dessa substância de atuar como desregulador

endócrino, tem direcionado pesquisas que buscam elucidar os mecanismos de ação, as consequências e a concentração de BPA no organismo humano (Kang et al., 2006).

3.2.3 Efeitos endógenos e exógenos

A maioria dos estudos sobre os efeitos toxicológicos causados por ftalatos tem se concentrado em DEHP, DBP e DiBP (Casals-Casas and Desvergne, 2011; Jiang et al., 2011; MacLeod et al., 2010; Sicińska, 2019; Sun et al., 2014; Trasande and Attina, 2015).

Esses estudos possibilitaram um entendimento dos efeitos danosos ao sistema reprodutor. Em roedores os efeitos tóxicos dos ftalatos incluem redução da distância anogenital, danos ao sistema reprodutor masculino, hipospádia, criptorquidia e na qualidade do sêmen. Portanto, a capacidade dos ftalato de ter uma atividade antiandrogênica em roedores é bem documentada (Akgül et al., 2019; Fernández et al., 2006; Jiang et al., 2011; Katsikantami et al., 2016; MacLeod et al., 2010).

A exposição humana a esses compostos tem sido relacionada a anomalias como endometriose, alterações no desenvolvimento do sistema reprodutor, puberdade e fertilidade prematura, câncer de pele e de mama, alergias e asma, obesidade, diabetes e resistência à insulina (Robinson and Miller, 2015).

Metabolitos de DEHP, BzBP e BPA podem estar ligados a problemas de desenvolvimento precoce da puberdade em adolescentes (Berger et al., 2018). E concentrações de DEHP e seus metabolitos, juntamente com BPA foram significativamente associados a casos de síndrome do ovário policístico (PCOS) em adolescentes de 12 a 18 anos (Akgül et al., 2019).

O efeito tóxico do BPA está relacionado à sua atividade estrogênica, que foi observada pela primeira vez em 1993 (Krishnan et al., 1993). Desde então um grande número de pesquisas demonstram que a ação desse composto é mediada por mecanismos genômicos e não genômicos, com efeitos que podem ser observados em concentrações próximas a $0,23 \text{ ng L}^{-1}$ (Vom Saal and Hughes, 2005).

Estudos sugerem que o BPA pode interagir com receptores de estrogênio, androgênio, receptores de hidrocarboneto aromáticos e receptores ativados por proliferadores de peroxissomos. Essas interações levam a efeitos danosos não somente

ao sistema endócrino, mas também potencializa dano a outros sistemas, tais como o imunológico e nervoso (Davis and Curtis, 2020; Drozdz et al., 2011; Rogers et al., 2013).

3.3 Limites e legislação

Os ftalatos DBP, BzBP, DiBP, DEHP foram classificados como de grande risco a saúde (European Commission, 2018). No Brasil, a legislação proíbe o uso de DEHP, DBP e BzBP, na produção de brinquedos vinílicos em concentração maior de 0,1% em massa. Em brinquedos destinados às crianças menores de três anos de idade, os ftalatos DiNP (Diisononil ftalato), DiDP e DnOP (Di-n-octil ftalato) em adição aos outros anteriormente mencionados não podem ter concentração superior a 0,1% em massa de material plastificado (INMETRO, 2007).

Em relação às embalagens de alimentos processados, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) elaborou uma lista positiva de aditivos para materiais plásticos. Nesta, fica estabelecido limites de migração específica (LME) para vários aditivos plásticos. Para os ftalatos BzBP, DBP, DiDP e DEHP ficou estabelecido LME de 30,0; 0,30; 9,0; 1,5 mg kg⁻¹, respectivamente e esses compostos só podem ser utilizados em embalagens de alimentos não gordurosos. Enquanto DEP, DCHP (Diciclohexil ftalato) e DOP (Dioctil ftalato), quando utilizados na produção de embalagens para armazenar alimentos com conteúdo de gordura superior 5%, a quantidade de ftalatos deve ser inferior a 5% m/m de material plástico e estes materiais não podem ter contato direto com o alimento (ANVISA, 2008). Os compostos DBP, DEHP, DMEP (Bis(2-metoxetila) ftalato), DnPP (Di-n-pentil ftalato) e BzBP (Benzil butil ftalato) não podem ser empregadas em produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes (ANVISA, 2016).

Os regulamentos que orientam o uso de bisfenol-A tem como principal objetivo preservar a saúde humana. Dentre todas as possíveis fontes de contaminação por BPA a exposição alimentar é a mais estudada e seus potenciais efeitos à saúde humana é a mais documentada. Portanto, a maioria das legislações tem por base a migração desse composto para alimentos.

Nas suas mais recentes publicações a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (*European Food Safety Authority – EFSA*) estabeleceu novos limites para a

Ingestão Diária Tolerável (*Tolerable Daily Intake – TDI*), especialmente, para bebês, crianças e adolescentes que são os grupos de maior vulnerabilidade. Para esse ficou estabelecido um TDI de 4 µg BPA/ kg de massa corpórea dia (EFSA, 2015).

Em 2018, a União Europeia determinou que o Limite de Migração Específica (*Specific Migration Limit – SML*) de vernizes ou filmes aplicados sobre superfícies interna de recipientes e embalagens de alimento não deve ser superior ao SML de 0,05 mg BPA/kg de alimento. Essa mesma legislação estabelece ainda, que para materiais que possam entrar em contato com alimentos destinados a recém-nascidos e crianças, nenhuma migração deve ser detectada (Vilarinho et al., 2019).

No Brasil, a regulamentação do uso de BPA é responsabilidade da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Essa na resolução RDC n° 56/2012, estabelece o Limite de Migração Específica (LME) de 0,6 mg BPA/kg de alimento e proíbe o uso desse composto na produção de mamadeiras e artigos similares utilizados na alimentação de lactantes e lactentes (Bernardo et al., 2015).

3.4 Metodologias de extração e análises

As metodologias de detecção e quantificação de ftalatos e BPA são variadas, mas as etapas de preparo das amostras, extração e *clean up*, são essenciais para garantir uma elevada sensibilidade e seletividade. Isso ocorre porque esses compostos estão presentes em matrizes complexas e muitas vezes em concentração baixa (Oliveira et al., 2008; Yamini et al., 2019). As matrizes biológicas contêm proteínas, lipídios e outras impurezas que podem interferir na detecção dos analitos (Oliveira et al., 2008; Reyes-Garcés and Gionfriddo, 2019).

Algumas técnicas de extração utilizadas em análises de bifenóis, ftalatos e seus metabolitos em diferentes matrizes são apresentadas na Tabela 2. Além das técnicas de SPE (Solid Phase Extraction) e LLE (Liquid Liquid Extraction), versões miniaturizadas como LLME (Liquid Liquid Microextraction), UVALLME (Ultrasound Vortex Assisted Liquid Liquid Microextraction) e HF-LPME (Hollow Fiber Liquid-Phase Microextraction) têm sido cada vez mais aplicadas a diversas análises (Oliveira et al., 2008).

O emprego de técnicas de extração miniaturizadas em análises biológicas está relacionado às vantagens dessas técnicas frente ao alto consumo de reagentes, tempo e

eficiência de técnicas tradicionais como SPE e LLE (Yamini et al., 2019). Russo et al. (2019), determinaram a concentração de 15 classes de poluentes em sangue e saliva empregando microextração líquido-líquido (LLME). Viñas et al. (2010) utilizaram microextração em fase sólida (*Solid Phase Microextraction* – SPME) para determinar a migração de bisfenol, bisfenol A e bisfenol S para alimentos enlatados. Em outro estudo, Amin et al., (2017) determinaram a concentração de metabólitos de ftalatos em sangue utilizando microextração líquido-líquido dispersiva (*Dispersive Liquid-Liquid Microextraction* – DLLME).

Tabela 2 – Metodologias de extração e análise de ftalatos, metabólitos de ftalatos e bisfenol A.

Referência	Analitos	Matriz	Técnica de Extração	Técnica de análise	Limites (ng/mL)
(Russo et al., 2016)	DMP, DEP, DBP, iBcEP, BBP, DEHP	Alimento congelado e comida de bebê	UVALLME	GC / MS	2 – 23 ^a (LOD); 3 – 43 ^a (LOQ)
(Fernandez et al., 2017)	MMP, MiBP, MBP, MCHP, MEHP, MiNP, MOP, MBzP, BPA	Urina	HF-LPME	GC /MS	0,777- 23,3 (LOD); 1,29 – 38,9 (LOQ)
(Cerqueira, 2018)	MiBP, MEP, MMP, MBP, MCHP, MEHP, MiNP, MOP, MBzP, DMP, DEP, DiBP, BPA	Saliva Urina	HF-LPME	GC/MS	0,03 – 0,53(LOD); 0,09 – 1,78(LOQ) 0,11-6,03 (LOD); 10,36-21,03 (LOQ)
(Fan et al., 2018)	DMP, DEP, DAP, DIPP, DPRP, DiBP, DBP, DMEP, DIPP, DEEP, BBP, DCHP, DHP, BMPP, DNHP, DBEP, DEHP, DNOP, DINP, DIDP	Embalagens de alimentos	LLE	UPLC/MS	0,02 – 0,10 (LOD) 0,05 – 0,25 (LOQ)
(Haned et al., 2018)	DMP, DEP, DBP, BBP, DEHA, DEHP, OP, NP, BP	Materiais plásticos	SPE LLE	GC / MS	0,04 – 3,13 (LOD) 0,03 – 6,65(LOD)
(Moura et al., 2020)	BPA	Urina	LLME	LC/MS	0,03 ^b (LOD); 0,1 ^b (LOQ)

4-tert-octilfenol (OP); benzophenona (BP); nonilfenol (NP); 2-isobutil ciclohexil ftalato (iBcEP);

a = ng/g; b= ng/mL.

3.5 Microextração em fase líquida suportada em fibra oca (HF-LPME)

A técnica de HF-LPME foi desenvolvida em 1999 por Pedersen-Bjergaard e Rasmussen (Pedersen-Bjergaard and Rasmussen, 1999). A nova metodologia

desenvolvida por Pedersen-Bjergaard e Rasmussen combinou os conceitos de extrações com membranas e o uso reduzido de solvente da técnica de SDME (Single Drop Microextraction). O uso de uma fibra porosa não somente melhorou a estabilidade do processo de extração como também impediu a perda de solvente durante esse processo (Pedersen-Bjergaard and Rasmussen, 2008).

HF-LPME consiste em uma membrana cilíndrica, oca que possui 70% de porosidade, 600 μm de diâmetro interno com poros de 0,2 μm e paredes com espessura de 200 μm (Figura 4). O interior dos poros e as paredes da fibra são impregnados com líquido ao mergulhar a fibra em solvente orgânico imiscível em água. O solvente fica imobilizado nas paredes e nos poros devido as forças capilares, formando assim um fino filme hidrofóbico. O interior da fibra, lúmen, é então preenchido com microlitros da fase aceptora. Nessa técnica os analitos são extraídos de uma amostra aquosa para um solvente imobilizado nos poros e na parede da fibra, e por último para a uma fase aceptora no interior da fibra (Esrafilí et al., 2018; Gjelstad, 2019; Pedersen-Bjergaard and Rasmussen, 2008).

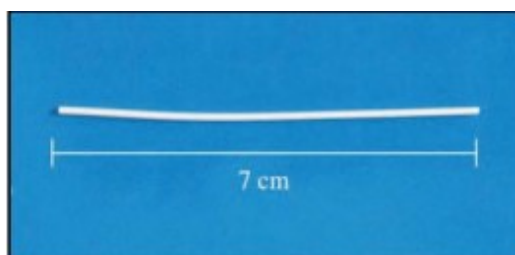


Figura 4 - Membrana de polipropileno usada na HF-LPME.

A técnica de HF-LPME é empregada em duas configurações principais: configuração em “U” e configuração em “haste” (rod-like). Na configuração em “U” (Figura 5 A), a fibra impregnada com solvente e preenchida com a fase aceptora, é conectada a duas microseringas. Na configuração em “haste” (Figura 5 B) apenas uma microseringa é conectada a fibra e a outra extremidade é selada (Oliveira et al., 2008).

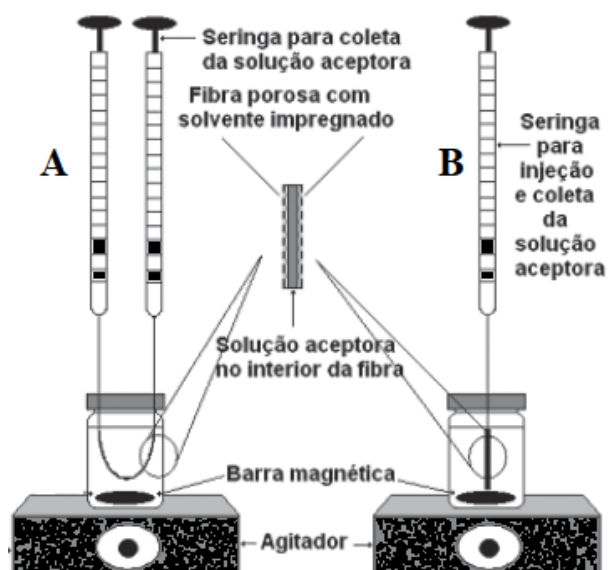


Figura 5 - Representação esquemática da microextração em fase líquida utilizando fibra oca com configuração (A) em U; (B) em haste. Adaptado de Oliveira et al., (2008).

A técnica de HF-LPME apresenta ainda dois modos de utilização baseado no número de fases envolvidas. Esses modos são HF-LPME em três fases e duas fases como apresentado na Figura 6.

- i. HF-LPME três fases: é composta pelas fases aquosa-orgânica-aquosa. Nesse modo a fase orgânica fica imobilizado nos poros e na parede da fibra oca. A fase orgânica fica expostas a duas fases aquosas, uma da amostra (fase doadora) e outra da fase aceitadora no interior da fibra oca. A fase orgânica atua como uma barreira impedindo o contato entre as fases doadora e aceitadora. Esse sistema é mais utilizado quando os analitos possuem grupos ionizáveis (Oliveira et al., 2008; Yamini et al., 2019).
- ii. HF-LPME duas fases: é composta por uma fase aquosa (fase doadora) e fase orgânica (fase aceitadora). Nesse modo a fase orgânica é a própria fase aceitadora isso permite a injeção direta da fase orgânica em equipamentos de cromatografia gasosa (GC). Esse sistema é capaz de extrair analitos neutros e hidrofóbicos de maneira mais eficiente que a HF-LPME em três fases (Oliveira et al., 2008; Yamini et al., 2019).

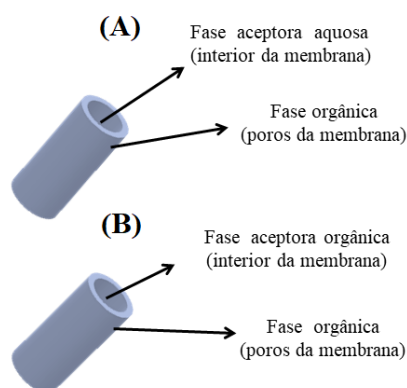
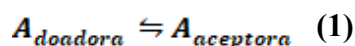


Figura 6 - Modos de extração utilizado na microextração em fase líquida suportada com fibra oca (HF-LPME): três fases (A) e duas fases (B).

No sistema de HF-LPME em duas fases, a eficiência de extração dos analitos decorre majoritariamente do coeficiente de partição entre a fase doadora e a fase aceitadora, que geralmente um solvente orgânico. Enquanto no sistema em três fases outros fatores precisam ser considerados para que ocorra uma extração eficiente, como por exemplo o gradiente de pH entre as fases doadoras e aceitadora. Ademais, o modo de HF-LPME em três fases é considerado mais eficiente que o de duas fases no que se refere ao processo de *clean – up* da amostra (Yamini et al., 2019).

3.5.1 Fundamentação teórica

O processo de extração de cada sistema pode ser representado por um equilíbrio químico. O mecanismo de extração de um sistema de HF-LPME em duas fases pode ser descrito pela reação de equilíbrio:



Onde A representa os analitos na amostra (fase doadora) e na fase orgânica (fase aceitadora) é representado por $A_{doadora}$ e $A_{aceptora}$, respectivamente.

A concentração do analito em cada fase pode ser determinada pelo coeficiente de partição. A concentração dos analitos em cada fase no equilíbrio é representado por $C_{eq,aceptora}$ e $C_{eq,doadora}$ nas fases orgânica e aquosa.

$$K_{aceptora/doadora} = \frac{C_{eq,aceptora}}{C_{eq,doadora}} \quad (2)$$

Ao considerar a transferência de massa e a equação (2) referente ao coeficiente de partição dos analitos entre as fases aceptora e doadora é possível determinar a recuperação (R) de analitos na fase orgânica (Pedersen-Bjergaard and Rasmussen, 2008).

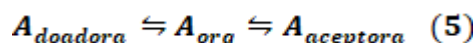
$$R = \frac{K_{aceptora/doadora} V_{org}}{K_{aceptora/doadora} V_{org} + V_{amostra}} \times 100\% \quad (3)$$

Onde V_{org} e $V_{amostra}$ representa o volume total da fase orgânica, portanto somatório do solvente presente nos poros e no interior da fibra, e o volume total da amostra, respectivamente.

A eficiência dos processos de LPME é comumente estabelecida pelo fator de enriquecimento (FE). Que informa a taxa de aumento de concentração do analito que ocorreu durante a extração.

$$FE = \frac{V_{amostra} R}{100V_{org}} \quad (4)$$

No sistema de HF-LPME em três fases a transferência dos analitos da fase doadora para a fase aceptora ocorre através de uma fase orgânica imobilizada nos poros da fibra. Nesse sistema, a equação de equilíbrio pode ser expressa como se segue:



Os parâmetros de recuperação e fator de enriquecimento para o sistema de três fases, deve considerar os coeficientes de partição entre a fase doadora e a fase orgânica bem como da fase orgânica com a fase aceptora.

$$R = \frac{K_{org/doadora} K_{acceptora/org} V_{acceptora}}{K_{org/doadora} K_{acceptora/org} V_{acceptora} + K_{acceptora/doadora} V_{org} + V_{amostra}} \times 100\% \quad (6)$$

$$FE = \frac{V_{doadora} R}{100 V_{acceptora}} \quad (7)$$

$K_{org/doadora}$ = coeficiente de partição entre a fase orgânica e a fase doadora.

$K_{acceptora/org}$ = coeficiente de partição entre a fase acceptora e a fase orgânica.

$V_{acceptora}$ = volume da fase acceptora.

V_{org} = volume da fase orgânica presente nos poros da fibra.

$V_{amostra}$ = volume total da amostra.

3.5.2 Características determinantes para HF-LPME

Ao utilizar técnicas de HF-LPME é necessário ter atenção à algumas características importantes que podem otimizar a extração de analitos, maximizando a recuperação e o fator de enriquecimento. Entre essas características estão ajuste de pH da amostra, força iônica, propriedades da membrana, tipo de solvente orgânico, tempo, temperatura e agitação do sistema de extração, bem como modificações na fase doadora (Oliveira et al., 2008; Venson et al., 2019).

3.5.2.1 Ajuste de pH

O ajuste de pH talvez seja um dos fatores mais importantes para a extração de analitos ácidos e básicos utilizando HF-LPME. A importância desse fator advém do seu efeito direto sobre os equilíbrio de dissociação e solubilidade de ácidos e bases, e dessa maneira melhora a distribuição de analitos da fase acceptora garantindo maior enriquecimento e recuperação dos analitos (Oliveira et al., 2008; Venson et al., 2019).

3.5.2.2 Agitação

O processo de extração por HF-LPME é frequentemente utilizado com agitação, uma vez que o emprego desse fator têm por objetivo agilizar a velocidade de extração, promovendo maior contato entre a fase doadora e o solvente orgânico (Oliveira et al., 2008). Entre as técnicas de agitação empregadas para aumentar a velocidade de extração estão agitação por barra magnética, vortex e ultrassom (Venson et al., 2019).

3.5.2.3 Tempo de extração

A melhora no desempenho da técnica de HF-LPME, assim como em outras técnicas de LPME, tem uma grande dependência do tempo de contato entre as fases doadora, orgânica e aceptora. O processo de extração, representado nas equações 1 e 5 envolve um equilíbrio, nesse caso a transferência de analitos da fase doadora para a fase aceptora aumenta com o tempo até atingir o equilíbrio onde a concentração de analitos entre as fases é constante (Oliveira et al., 2008).

Em HF-LPME o tempo de extração pode ser influenciado pelo tipo de agitação e pela natureza da matriz. Na maioria dos estudos empregando técnicas de HF-LPME o tempo requerido para o equilíbrio varia entre 15 e 60 minutos (Pedersen-Bjergaard and Rasmussen, 2008; Venson et al., 2019).

3.5.2.4 Solvente – fase orgânica

A seleção de solventes orgânicos que compõem a fase orgânica é uma etapa importante no desenvolvimento de métodos HF-LPME. Algumas propriedades importantes dos solventes devem ser consideradas, como a reduzida solubilidade ou insolubilidade em água, baixa volatilidade, compatibilidade com a fibra e a solubilidade dos analitos (Oliveira et al., 2008).

Todas essas características contribuem para reduzir a perda de fase orgânica, melhorar a imobilização dos solventes nos poros da fibra e garantir a transferência de analitos para a fase aceptora (Oliveira et al., 2008; Pedersen-Bjergaard and Rasmussen, 2008; Yamini et al., 2019). Entre os solventes normalmente utilizados em HF-LPME estão hexano, 1-octanol, dihexil éter e tolueno (Kokosa, 2019).

3.5.2.5 Modificações da fase doadora

Modificações nas fases doadoras e aceptoras podem melhorar a extração dos analitos. Entre as modificações importantes estão adição de sais, formação de pares iônicos e modificadores orgânicos (Gjelstad, 2019; Yamini et al., 2019).

- Adição de sais

A adição de sal objetiva promover o efeito *salting-out* que pode resultar em um aumento ou diminuição da eficiência de extração. No processo de *salting-out*, a adição de sais na fase doadora modifica a dinâmica de

hidratação dos analitos, pois as moléculas de água passam a hidratar também os íons adicionados. Como resultado pode ocorrer um aumento da disponibilidade dos analitos para serem extraídos para fase orgânica. Entretanto, adição de sais também podem causar efeito deletérios à extração como interação dos íons com os analitos e aumento da viscosidade da matriz (Oliveira et al., 2008; Venson et al., 2019).

- Formação de pares iônicos

A formação de pares iônicos objetiva a formação de espécies neutras de analitos ionizáveis. Essa formação pode ser feita utilizando reagentes aniônicos ou catiônicos. Entre os reagentes mais utilizados estão aminas quaternárias, ácidos octanoico, decanoico e seus sais, e álcoois lipofílicos de cadeia longa. Para a formação de pares iônicos ajuste de pH é crucial para a extração (Oliveira et al., 2008).

- Modificadores orgânicos

A adição de modificadores orgânicos é importante para análise de compostos ligados a proteínas, uma vez que essa ligação pode ser muito intensa e prejudicar a extração dos analitos. Para romper as interações hidrofóbicas e polares existentes entre os analitos e as proteínas podem ser utilizados solventes orgânicos. Entretanto esse solventes também podem reduzir a eficiência de extração, pois a distribuição de analitos entre as fases doadoras e orgânicas podem ser afetados (Oliveira et al., 2008).

4 Determinação de ftalatos e bisfenol – A em saliva

4.1 Materiais e métodos

4.1.1 Materiais e equipamentos

- Frascos de vidro transparente com tampa de rosca de capacidade de 20,0 mL da Supelco (Bellefonte, EUA);
- Micropipetas de volume variado modelo Finnpiquette da Thermo Scientific (West Palm Beach, EUA);

- Agulhas hipodérmicas descartáveis adquiridas da BD PrecisionGlide (Franklin Lakes, EUA);
- Septo de borracha em PTFE de 20mm de diâmetro adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA);
- Membrana capilar de polipropileno, Accurel PP Q3/2 (600 µm de diâmetro interno, 0,2 µm de tamanho dos poros e 200 µm de espessura da parede) (Wuppertal, Alemanha);
- Purificador de água Elga Purelab Classic (São Paulo, Brasil);
- Banho de ultrassom USC 2800 da Unique (Indaiatuba, Brasil) com frequência de 40 kHz e potência de 120 W;
- Chapa aquecedora com controle de temperatura e agitação magnética da IKA RHon (Wilmington, EUA);
- Agitador de tubos vortéx modelo AP 56 da Phoenix (Araraquara, Brasil);
- Freezer 120 litros da Consul (São Bernado do Campo, Brasil);
- Balança analítica modelo AUW220D da Shimadzu (Quioto, Japão);
- Microcentrífuga modelo Mikro 120 da Hettich (Tuttlingen, Alemanha);
- Cromatógrafo gasoso modelo Finnigan Trace DSQ equipado com um espectrômetro de massas do tipo armadilha de íons (ion trap) Thermo Scientific (West Palm Beach, EUA);
- pHmetro de bancada modelo pHB 500 da Ion (Araucária, Brasil);

4.1.2 Preparo das vidrarias

Todas as soluções e padrões foram preparadas e armazenadas em materiais de vidros para prevenir a contaminação por ftalatos oriundos dos materiais plásticos. As vidrarias foram lavadas várias vezes com água ultrapura antes de passar por um banho ultrassônico em acetona por 30 min. As vidrarias então foram secas a 250 °C por 4 h e tampadas com papel alumínio.

4.1.3 Padrões e soluções

Os padrões de quatro ftalatos: Dietilftalato (DEP), Dibutilftalato (DBP), Disobutilftalato (DiBP), Dimetil ftalato (DMP), Bis(2-etilhexil) ftalato (DEHP) e um bisfenol A (BPA) foram adquiridos da AccuStandard (New Haven, EUA). Soluções estoque de cada padrão foram preparadas na concentração de 500 mg.L^{-1} em acetonitrila de grau HPLC obtidos da J.T Baker (Xalostoc, Mexico).

As soluções de trabalho foram preparadas por diluição das soluções estoque. Todas soluções preparadas foram acondicionadas em frascos âmbar para prevenir a fotodecomposição e armazenadas sob refrigeração a 4°C .

4.1.4 Preparo de amostras de saliva

As amostras de salivas foram coletas de pacientes que realizaram procedimentos odontológicos na faculdade de odontologia (UFMG) e cedidas para serem utilizadas nesse trabalho. Foram utilizadas 60 amostras de saliva coletadas de 20 crianças de 6 a 11 anos de idade de ambos os sexos com boa higiene bucal e que apresentavam diagnóstico de mordida aberta anterior. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (Resolução CNS 466/2012-CAAE: 87714218.0.0005149). As amostras utilizadas nesse trabalho correspondem a três tempo distintos do procedimento odontológico para a correção de mordida anterior utilizando esporões. Amostras de saliva foram coletadas antes da colagem dos esporões com adesivo odontológico Transbond XT da empresa 3M (Monrovia, USA), trinta minutos e vinte quatro horas após o procedimento de colagem dos esporões.

O processo de preparo das amostras foi adaptado do trabalho de Cerqueira (2018), $1,00 \text{ mL}$ de amostra e $210,00 \mu\text{L}$ de ácido fosfórico ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$) foram adicionados a um frasco de vidro. A mistura foi centrifugada por 6 minutos à 14000 rpm . Em seguida, o sobrenadante foi diluído em $10,00 \text{ mL}$ de água ultrapura. O pH da solução foi ajustado, quando necessário, para 6-7 com hidróxido de amônio (50% v/v).

4.1.5 Método de extração HF-LPME

4.1.5.1 Fibra porosa

Nesse trabalho foi utilizado em todos os ensaios uma fibra de polipropileno da Accurel PP Q3/2 (Wuppertal, Alemanha) de 600 μm de diâmetro interno, 0,2 μm de tamanho de poros e 200 μm de espessura de parede com 70% de porosidade, cortada no comprimento de 7,0 cm.

4.1.5.2 Avaliação do solvente de extração

Com objetivo de determinar o melhor solvente extrator para os analitos desse trabalho, preparou-se uma solução aquosa contendo todos os analitos na concentração de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$. O procedimento de extração foi testado utilizando três solventes: octanoato de etila, octanol e uma solução de octanoato de etila e octanol (50% v/v).

O processo de condicionamento da fibra foi realizado mergulhando 7 cm de fibra oca em octanol por 10 segundos. O excesso de solvente foi removido em proveta contendo água ultrapura imerso em um banho ultrassônico por 10 segundos. Posteriormente, a fibra foi preenchida, com o auxílio de uma microseringa, com 15 μL de octanol. Subsequentemente a fibra foi introduzida em um frasco contendo 9 mL de solução aquosa na concentração de 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito. O processo de extração foi realizado sob agitação por 55 minutos. Esse processo foi repetido utilizando octanoato de etila e uma solução de octanoato de etila e octanol (50 % v/v).

4.1.5.3 Avaliação do pH de extração

Para avaliar o efeito da variação de pH, preparou-se uma solução aquosa contendo todos os analitos na concentração de 40 $\mu\text{g L}^{-1}$ preparada utilizando água ultrapura. A influência pH foi avaliada em meio ácido (pH = 2), meio neutro (pH = 7) e meio básico (pH = 10). Cada faixa de pH foi analisada em triplicada. O pH foi ajustado utilizando ácido clorídrico (50 % v/v) e hidróxido de amônio (50 %v/v).

4.1.5.4 Condicionamento da fibra e extração dos analitos

O procedimento de condicionamento consistiu em mergulhar a fibra porosa em uma proveta contendo solvente extrator por 10 segundos. Em seguida o excesso de solvente foi retirado em proveta contendo água ultrapura imerso em um banho ultrassônico por 10 segundos.

Após o condicionamento da fibra, ela foi preenchida com 15,00 μL de solvente extrator. O preenchimento da fibra foi realizado utilizando uma microseringa. A fibra foi então fixada em duas agulhas e posicionada no interior de um frasco contendo 9,00 mL de amostra contendo os analitos. O procedimento de extração foi realizado por 55 min com agitação de 2000 rpm sem aquecimento (Figura 7).

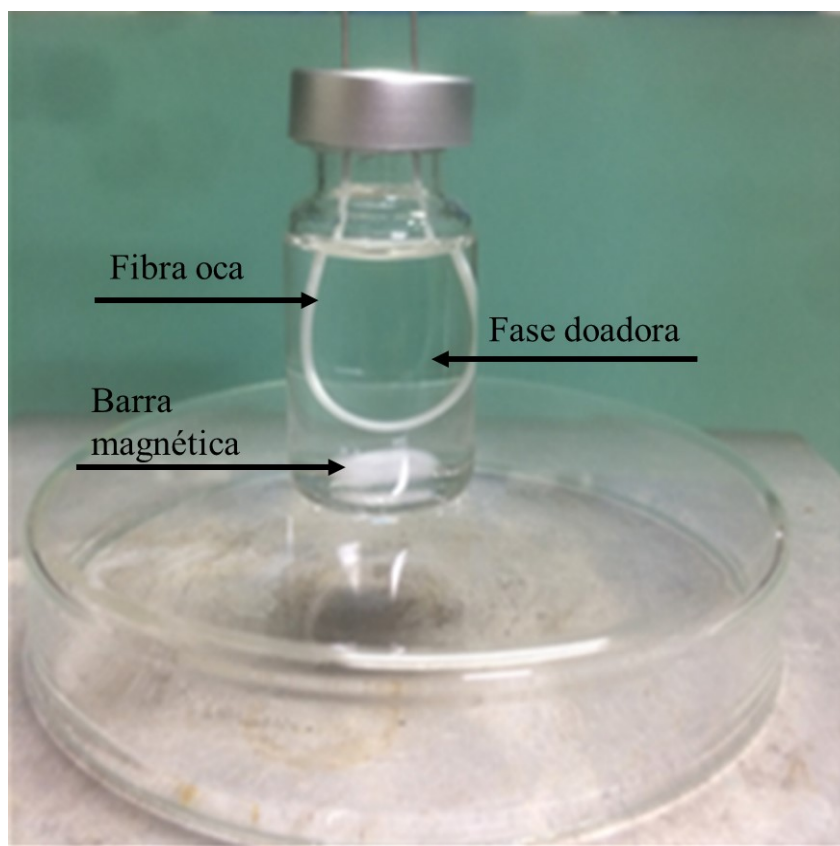


Figura 7 - Sistema de extração HF-LPME composto pelo frasco de extração contendo uma barra magnética para agitação, a amostra com os analitos e uma fibra de polipropileno de 600 μm de diâmetro interno, 0,2 μm de tamanho de poros e 200 μm de parede com 70% de porosidade, cortada no comprimento de 7,0 cm e suportada em duas agulhas de seringa hipodérmica.

4.1.6 Derivatização

Uma das maiores limitações da técnica de cromatografia gasosa é a análise de compostos não voláteis. Uma alternativa para superar essa limitação é transformar os compostos não voláteis, por meio de reações químicas, em derivados mais voláteis (He, 2012).

As reações de derivatização não apenas produzem compostos mais voláteis como também melhora a estabilidade térmica dos analitos, o sinal dos detectores uma vez que

ocorre a adição de grupos funcionais que produzem sinais elevados no detector, bem como possíveis melhoras na separação cromatográfica. Dentre as diferentes reações de derivatização as mais comuns são sililação, esterificação, acetilação e alquilação (Parkinson, 2012).

As reações de derivatização frequentemente aplicadas a álcoois e fenóis são sililação (Figura 8) e acetilação. Sililação é reação de derivatização comumente utilizada em análise de BPA por GC/MS (Moreira et al., 2017). O agente derivatizante BSTFA (N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide) com 1% de TMCS (Trimetilsilil) é um dos mais utilizados nesse tipo de reação pois garante produtos com alta volatilidade e uma alta taxa de sililação além de proporcionar produtos da reação com elevada estabilidade térmica e química.

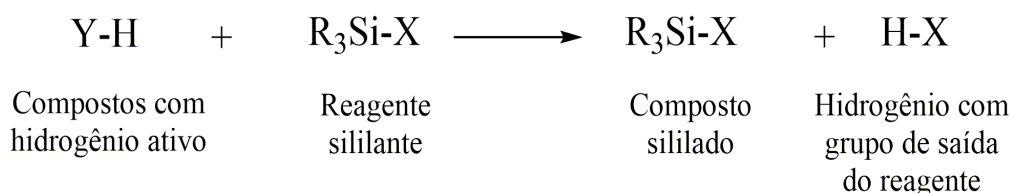


Figura 8 - Reação geral de formação de um derivado sililado. (Farajzadeh et al., 2014).

Neste trabalho, o procedimento de derivatização foi realizado após a extração dos analitos: 8,00 µL do extrato foi adicionado a 15,40 µL do agente derivante N, O – bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) com 1% de TMCS (Trimetilsilil) e 3,00 µL de acetonitrila. O sistema foi agitado por 30 segundos e depois deixado em repouso por 5 min. Após o tempo de repouso, foi realizada a análise por GC/MS.

4.1.7 Análise cromatográfica

4.1.7.1 Instrumentação

As análises foram realizadas em cromatógrafo a gás modelo Finigan Trace DSQ equipado com um analisador de massas do tipo armadilha de íon (IonTrap) da ThermoScientific (West Palm Beach, EUA). A coluna capilar utilizada foi uma HP-5MS (5% fenil – 95% dimetilsiloxana) de dimensões 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm da Agilent Technology (Santa Clara, EUA).

Foi estabelecido um programa de temperatura do forno que iniciou à 120 °C, seguido de um aquecimento de 5 °C min⁻¹ até 190 °C, aquecimento de 15 °C min⁻¹ até 210 °C, aquecimento de 5 °C min⁻¹ até 230 °C mantida por 2 min, aquecimento de 30 °C min⁻¹ até 250 °C mantida por 5 min. O corte do solvente foi fixado em 3 min e o tempo total de corrida foi de 27 min. O gás de arraste utilizado foi hélio (99,999%) com fluxo de 1,3 mL min⁻¹. A temperatura do injetor foi programada para 250 °C no modo splitless por 1,2 min, seguido por uma taxa de 1:50 no modo split. O MS operou no modo de ionização de elétrons (Electron Ionization - EI) 70 eV. A temperatura da interface GC/MS foi de 300 °C e temperatura da fonte de íons foi de 250 °C. A análise foi realizada no modo Segment Scan. As razões massa/carga (*m/z*) monitoradas para foram DMP (**163**, 133, 77); DEP (149, **177**, 222); DiBP e DBP (**149**, 205, 223); DEHP (149, **167**, 279) BPA (357, **372**, 207), em negrito são os valores utilizados como fragmentos de quantificação. A Figura 9 apresenta as prováveis estruturas de fragmentação desses analitos.

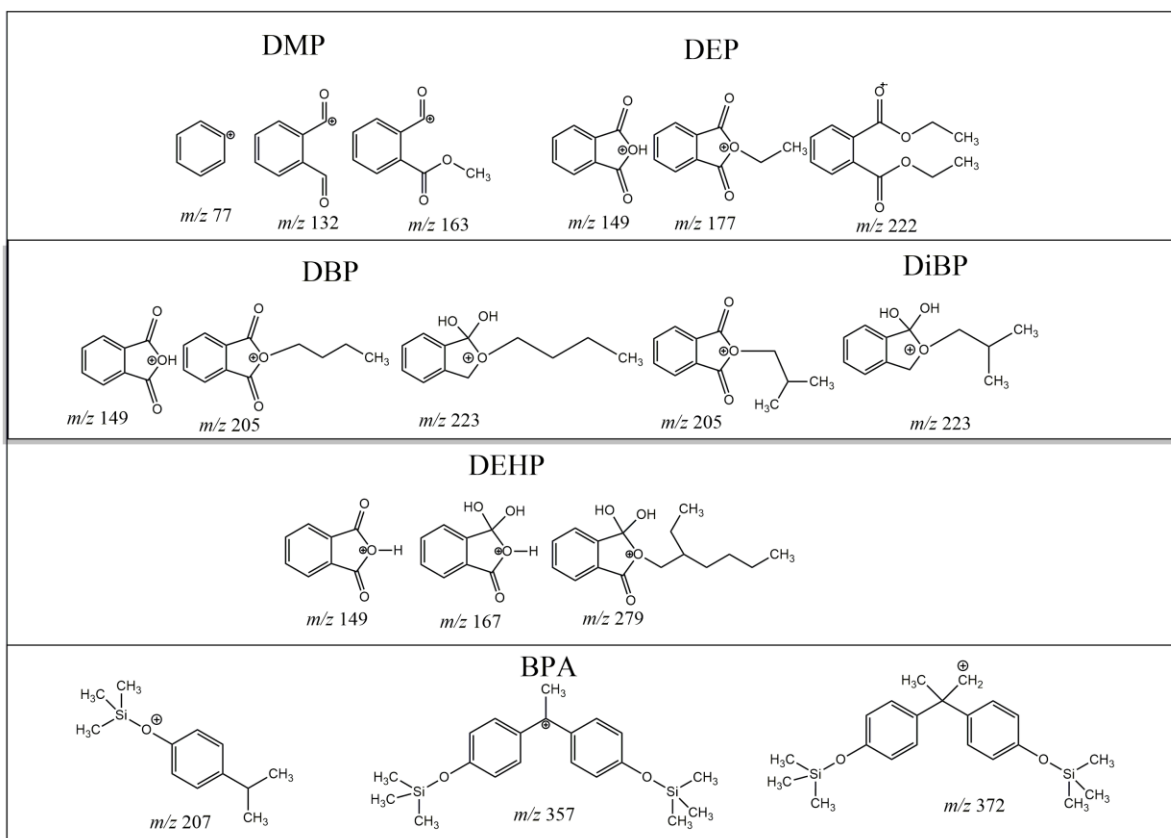


Figura 9 – Possíveis estruturas de fragmentação dos compostos estudados

4.1.8 Parâmetros de mérito

Neste trabalho foram avaliados os seguintes parâmetros de méritos: seletividade, linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e precisão. Toda validação foi realizada de acordo com os procedimentos do Guia Eurachem 2014 (Magnusson and Örnemark, 2014). Foi utilizada saliva artificial como matriz para a determinação de todos os parâmetros de mérito. Para o preparo da saliva artificial dissolveu-se 0,17 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0,11 g de $CaCl_2$, 0,58 g de K_2HPO_4 , 0,53 g de K_2CO_3 , 0,34 g de $NaCl$ e 0,76 g KCl , em 1 L de água ultrapura, e em seguida o pH foi ajustado para 6-7 com uma solução de HCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. Após o preparo a saliva artificial foi armazenada sob refrigeração.

As curvas analíticas foram construídas com sete níveis, em triplicata, nas seguintes faixas de concentração: $5,00 - 150,00 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ para DMP e BPA; $10,00 - 150,00 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ para DEP, DBP e DiBP.

A precisão intra e inter-dia foi obtida utilizando 5 replicadas das concentrações $5,00$; $50,00$ e $150,00 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. Os resultados obtidos foram expressos em coeficiente de variação (CV). A precisão inter-dia constitui da análise em dois dias consecutivos das concentrações acima mencionadas. Enquanto a precisão intra-dia foi realizada em um único dia.

Para avaliar a recuperação, analisou-se 10 replicadas de saliva artificial com adição de padrão na concentração de $40 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. Os resultados obtidos para as amostras de saliva artificial com adição de padrão foram comparados com aquelas nas quais não foram adicionados padrão. A recuperação foi obtida utilizando a equação de recuperação.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{x' - x}{c} \times 100$$

Onde X' é o valor médio da concentração da saliva artificial enriquecida, X é o valor médio da saliva artificial sem enriquecimento e C a concentração adicionada.

Utilizando o parâmetro de recuperação, determinou-se o fator de enriquecimento (FE) do método HF-LPME. Esse fator é importante porque informa o grau de

transferência do analito entre as fases doadora e aceptora. O FE foi calculado utilizando a equação 4.

4.2 Resultados e discussões

4.2.1 Método de extração HF-LPME

4.2.1.1 Avaliação do solvente de extrator

A escolha do melhor solvente de extração é crucial para o método HF-LPME, pois esse fator influencia a transferência dos analitos da amostra para a fase aceptora. O solvente orgânico empregado em HF-LPME deve atender a requisitos de baixa volatilidade, imiscibilidade ou baixa miscibilidade em água, compatibilidade com a fibra e com os analitos. Os solventes 1-octanol e octanoato de etila foram selecionados pois possuem não apenas os requisitos anteriormente mencionado, mas também solubilidade adequada dos analitos estudados. Para cada solvente a extração foi realizada em triplicada, os resultados estão apresentados no gráfico de barras (Figura 10).

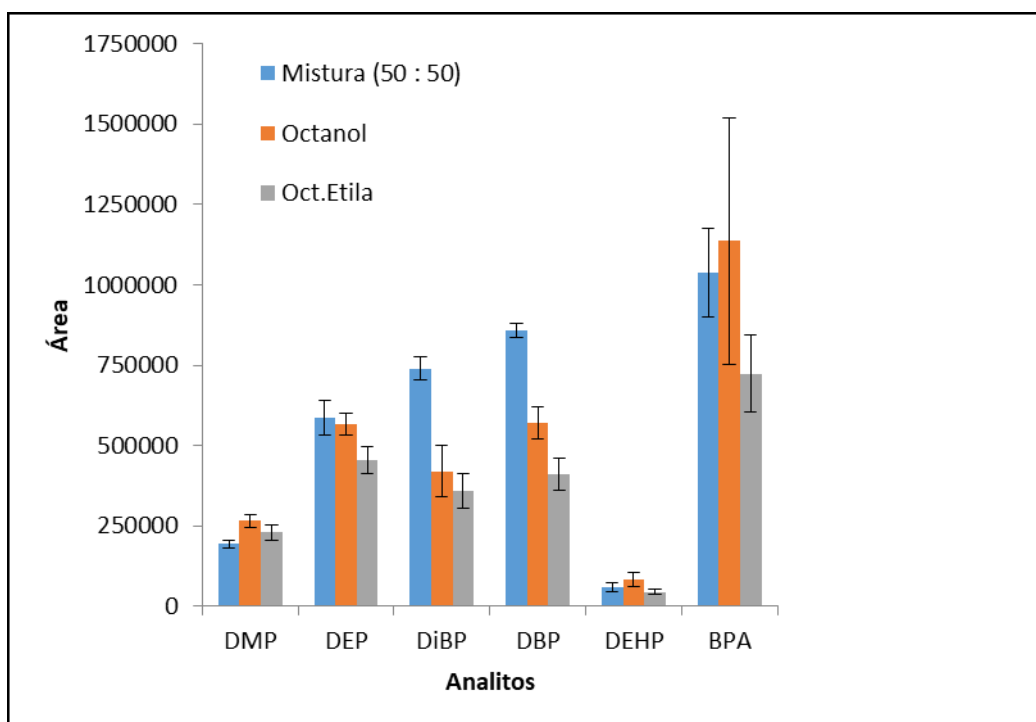


Figura 10 - Comparação entre as áreas cromatográficas obtidas por GC/MS após a extração de BPA e ftalatos de uma solução aquosa de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ ($n=3$) utilizando diferentes solventes e derivatização com BSTFA. As áreas foram calculadas utilizando cromatograma de íon extraído (EIC) para cada composto.

Pode-se observar na Figura 10, que os solventes que extraíram de forma mais eficiente os analitos apresentaram maiores áreas cromatográficas. O octanol foi melhor solvente extrator que a mistura de solventes na extração do DMP e DEHP. Enquanto a mistura dos solventes octanol e octanoato de etila foi consideravelmente melhor que o octanol na extração do DiBP e DBP. Para o BPA, houve uma maior eficiência de extração quando o solvente extrator foi o octanol porém esse resultado carregou também uma grande imprecisão. O DEP foi mais bem extraído pela mistura de solventes, porém quando se considera os resultados obtidos e os erros associado a extração com octanol e a realizada com a mistura de solventes, não há grandes diferenças entre as áreas.

Ao aplicar o teste estatístico ANOVA aos resultados obtidos, foi observado diferenças significativas entre as médias das áreas dos analitos DMP, DiBP e DBP. O teste de Tukey revelou que as diferenças significativas ocorreram entre os solventes extratores octanol e a mistura de solventes no caso do DMP, e entre octanoato de etila e a mistura de solventes para os analitos DiBP e DBP. A Tabela 3 mostra as médias das áreas obtidas para DMP, DiBP e DBP nos diferentes solventes.

Tabela 3 - Médias das áreas obtidas para DMP, DiBP e DBP que exibiram diferenças significativa nos solventes avaliados como solventes de extração.

Analito	Mistura		Octanol		Octanoato de etila	
	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio
DMP	193433,50	12438,71	266406,00	19105,38	229953,50	25084,61
DiBP	740364,00	35680,61	420919,50	79719,92	359171	52478,64
DBP	856502,00	22213,05	570653,00	50544,84	410417,50	49172,91

Ao analisar a Tabela 3, é possível perceber que para o DMP as maiores áreas foram obtidas utilizando o octanol como solvente de extração. Isso não apenas reforça a maior afinidade desse composto pelo solvente, mas também a influência da polaridade do solvente e do analito no processo de extração por HF-LPME. Para o DiBP e DBP as maiores áreas foram alcançadas quando o solvente extrator utilizando foi a mistura dos solventes octanol e octanoato de etila. O melhor desempenho da mistura na extração desse analitos, quando comparado com os outros solvente, pode ser atribuído à uma

polaridade intermediária alcançada quando os solventes octanol e o octanoato de etila são misturados.

Considerando que a extração de DiBP e DBP foi significativamente maior quando a mistura de solventes foi utilizada no processo de extração e que para a maioria dos analitos não houve diferenças significativas ao empregar outros solventes, a mistura de octanoato de etila e octanol (50% v/v) foi selecionada como solvente extrator para o método HF-LPME.

4.2.1.2 Avaliação do pH de extração

O pH é um dos aspectos mais importante em metodologias baseadas em LPME e no método HF-LPME esse fator pode influenciar a distribuição dos analitos nas diferentes fases que compõem o sistema. O resultado do efeito de cada faixa de pH no processo de extração é apresentado na Figura 11. Os dados foram obtidos utilizando como solvente extrator a mistura de octanol e octanoato de etila (50% v/v).

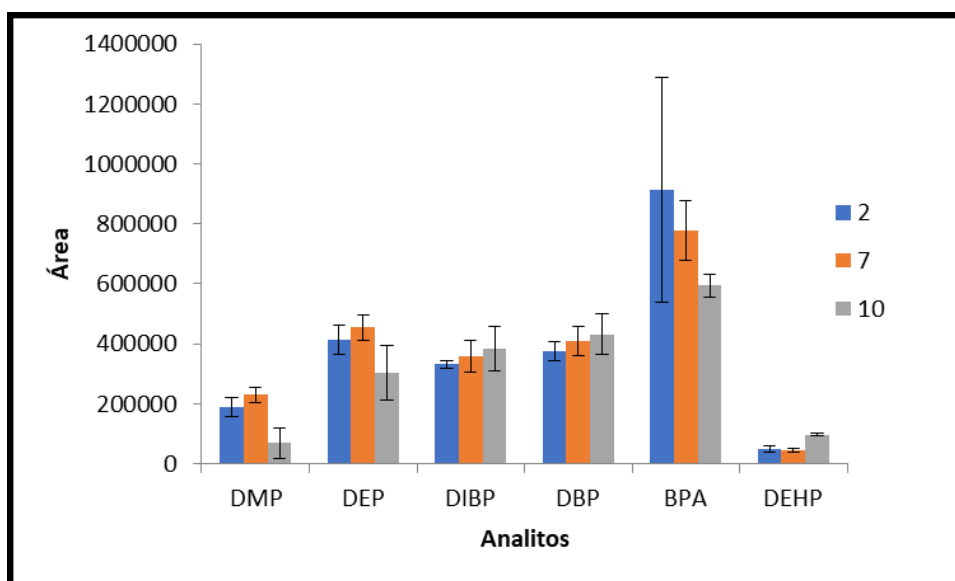


Figura 11 - Comparação entre os pH para extração dos analitos em meio ácido (pH =2), neutro(pH=7) e básico(pH=10), utilizando como solvente extrator a mistura de octanoato de etila e octanol (50 % v/v) e tempo de extração de 55 min. As áreas foram obtidas utilizando por de íon extraído (EIC).

Ao analisar a figura é possível observar que para os ftalatos de cadeia carbônica menor, como o DMP e DEP, valores de áreas ligeiramente maiores foram obtidas em pH 7. Enquanto para os ftalatos de cadeia maiores o melhor desempenho da extração foi observado em pH 10. O BPA, apesar de uma extração maior em pH 2, apresenta uma

imprecisão muito grande nessa medida. A elevada imprecisão observada pode ser resultado do processo de extração ou de derivatização.

Para avaliar os resultados foi utilizado ainda os testes estáticos ANOVA e teste de Tukey. O teste ANOVA mostrou que houve uma diferença significativa nas médias de áreas obtidas para o DMP e DEHP nos valores de pH estudados. O teste de Tukey foi aplicado com o objetivo de determinar quais condições de pH diferem entre si. De acordo com os resultados obtidos, o meio neutro (pH=7) apresenta resultado distinto do meio básico (pH=10) para o DMP e os meios ácido (pH=2) e básicos apresentam valores estatisticamente iguais. Para o DEHP, o meio básico é distinto do meio ácido e neutro. A Tabela 4 mostra que para o DMP os valores médios de áreas obtidos para o meio ácido e neutro são maiores que os valores obtidos para o meio básico e que apenas para o DEHP o meio básico apresenta valores médios maiores que os valores médios dos meios ácido e básico.

Tabela 4 - Áreas obtidas para os analitos nos valores de pH analisados.

Analito	pH 2		pH 7		pH 10	
	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio
DMP	189.449,51	31.567,37	229.953,53	25.084,61	68.953,36	51.160,59
DEHP	50.274,57	11.305,93	45.399,02	6.881,56	97.448,49	2.749,94

Considerando os resultados apresentados na Figura 11 e na Tabela 4, foi importante ajustar o pH apenas de amostras básicas, uma vez que não houve diferenças significativas na extração da maioria dos analitos de uma fase doadora ácida ou neutra.

4.2.2 Parâmetros de mérito

4.2.2.1 Seletividade

O método apresentou boa seletividade, pois foi possível identificar todos os analitos com adequada resolução cromatográfica. Na Figura 12 A é possível observar que o método desenvolvido aliado com os procedimentos de preparo das vidrarias contribuiu para obtenção de brancos com o mínimo de contaminação por ftalatos e BPA.

A Figura 12B mostra o cromatograma obtido a partir de uma solução, preparada com saliva artificial, contendo os analitos na concentração $150 \mu\text{g L}^{-1}$.

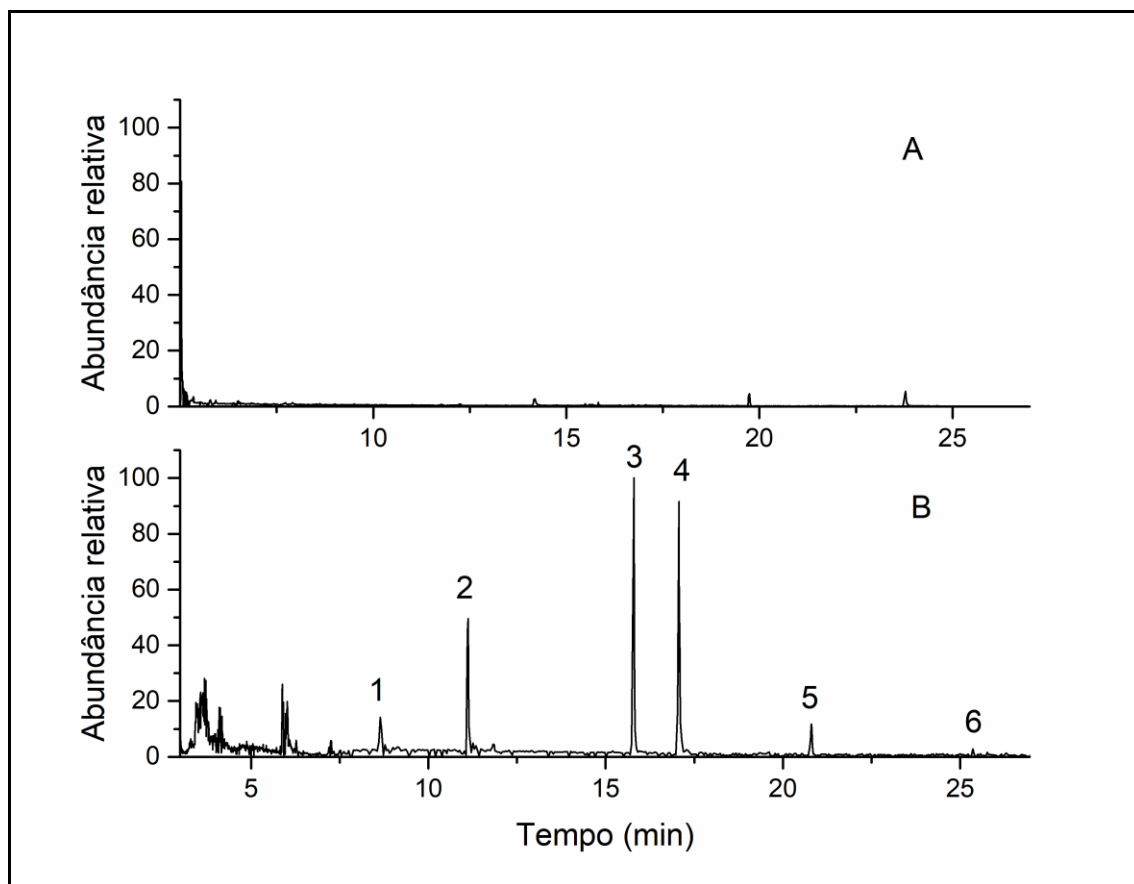


Figura 12 - Cromatogramas de íon extraído (EIC) obtido por GC/MS de uma amostra de branco (A) e de uma solução padrão de ftalatos e BPA em saliva artificial na concentração de $150 \mu\text{g L}^{-1}$. Ambos EIC foram obtidos após extração com uma mistura de octanoato de etila e octanol (50% v/v) e após a derivatização com BSTFA contendo 1% de TMCS (1 - DMP; 2 - DEP; 3 - DiBP; 4 - DBP; 5 - BPA; 6 - DEHP).

A aquisição no espectrômetro de massas foi no modo *segment scan*. Neste modo a faixa de massas é dividida em até dez segmentos menores onde ocorre *full scan*. Utilizando faixas menores de m/z ocorre uma redução da interferência de íons de *background*, aumentando a sensibilidade do equipamento quando comparado com o modo de aquisição em *full scan*. Além disso, a análise cromatográfica foi realizada apenas 27 minutos.

4.2.3 Linearidade, LOD e LOQ

As curvas analíticas foram construídas em sete níveis utilizando como matriz uma solução de saliva artificial. A avaliação da relação entre as variâncias das respostas instrumentais e as concentrações revelou comportamento homocedástico. Portanto todos os modelos lineares foram construídos utilizando o método dos mínimos quadrados ordinário (MMQO). Os coeficientes de determinação linear (R^2) obtidos foram todos acima de 0,955 o que indica um bom ajuste aos modelos propostos. Os limites de detecção e quantificação foram calculados a partir da análise de dez amostras de uma solução da saliva artificial sem adição dos analitos. Os LOD e LOQ variaram entre 0,36–1,97 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 0,66–6,56 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, como mostra a Tabela 5.

Os valores encontrados para LOD e LOQ obtidos neste trabalho estão consistentes com dados obtidos por outros pesquisadores. Özer e Güçer (2011) em seu trabalho sobre a migração de ftalato de brinquedos para saliva artificial, obtiveram LODs que variaram de 1,3 a 5,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ para DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP e DnOP (Özer and Güçer, 2011). Al-Natsheh et al. (2015), determinaram o LOD para DiBP, DBP, DMEP, BBP, DEHP, DnOP, DiNP e DiDP entre 0,01 e 0,32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Al-Natsheh et al., 2015). Em outro trabalho, onde foi avaliado a presença de 15 DEs em saliva, os LOQ e LOD para os metabolitos de DBP (MBP, MCPP), DBzP (MBzP), DiBP (MiBP) e DEHP (MEHP, MEHHP e MEOHP) variaram entre 0,015-3,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 0,05 - 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Vu et al., 2020).

O analito DEHP foi utilizado nos estudos de otimização do solvente e do pH, entretanto na etapa de validação os modelos lineares obtidos apresentaram coeficientes de determinação baixos ($R^2 < 0,65$). Esses resultados podem ser atribuídos não somente a contaminações decorrentes da ubiquidade desse composto, mas também há problemas em etapas sensíveis a erros como a extração e injeção manual da amostra no GC/MS.

Tabela 5 - Faixa linear, equação do modelo, coeficiente de determinação, limites de detecção e quantificação do método HF-LPME-GC/MS.

Analito	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Equação	R ²	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
DMP	5-150	$Y = 1117,081(\pm 45,39)x + 7,09E-07(\pm 3498,21)$	0,992	0,6	1,94
DEP	10-150	$Y = 1250,298(\pm 35,58)x - 2,96E-6(\pm 2653,24)$	0,995	1,51	5,36
DBP	10-150	$Y = 3877,91(\pm 111,68)x - 6,15E-6(\pm 9381,28)$	0,995	1,58	5,26
DiBP	10-150	$Y = 3643,38(\pm 141,98)x + 2,91E-11(\pm 11375,89)$	0,979	1,97	6,56
BPA	5-150	$Y = 20275,12(\pm 1530,16)x + 6,37E-5(\pm 131956,77)$	0,955	0,32	0,66

4.2.3.1 Precisão, Recuperação e Fator de Enriquecimento

Os experimentos para avaliar a precisão inter e intradia foram realizados em três níveis de concentrações, $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$; $50,0 \mu\text{g L}^{-1}$; e $150,0 \mu\text{g L}^{-1}$. Estes experimentos foram realizados pelo mesmo analista em dois dias consecutivos com cinco replicadas para cada nível de concentração. Os coeficientes de variação (CV), obtidos variaram entre 2,62 – 19,56 % (Tabela 6) todos esses abaixo de 20 % que é o valor recomendado pelo guia da Eurachem.

Tabela 6 – Cálculo da recuperação, fator de enriquecimento teórico e precisão intra e inter-dia para o método HF-LPME-GC/MS aplicado a saliva artificial.

Analito	Recuperação (%)	FE Teórica	Precisão Intra CV(%)			Precisão Inter CV(%)		
			5 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	50 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	150 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	5 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	50 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	150 ($\mu\text{g L}^{-1}$)
DMP	125	750	8,71	15,83	15,96	7,47	1,47	19,02
DEP	105	630	15,57	18,43	19,56	14,95	2,64	16,09
DBP	80	480	19,46	13,03	14,53	5,48	11,68	17,63
DiBP	106	636	13,02	3,34	9,96	14,14	6,42	16,77
BPA	119	714	9,00	18,11	9,43	9,95	4,49	2,62

Os valores obtidos para a precisão do método foram similares a aqueles encontrados na literatura referentes ao emprego de HF-LPME. Fernandez et al. (2017), empregaram o método de HF-LPME para identificar BPA e metabolitos de ftalado em

urina obteve coeficientes de variação entre 12,00% e 19,70% para MBzP, MiNP, MOP, MMP, MCHP e MiBP (Fernandez et al., 2017).

Os resultados mostraram ainda uma boa recuperação (80 – 125%) como recomendado pelo guia de validação da Eurachem. Os valores de F.E foram acima de 100%, valor de referência para a eficiência do método HF-LPME em pré-concentrar os analitos. Os valores de recuperação e F.E obtidos nesse trabalho também estão com resultados encontrados na literatura. Sobhi et al. (2019), empregaram HF-LPME para quantificar sete compostos carbonílicos (acetaldeído, propanal, butanal, hexanal, glioxal e metilglioxal) em águas residuárias e obtiveram valores de recuperação variando entre 85 e 113%.

4.2.4 Aplicação em amostras reais

O método desenvolvido e validado foi aplicado em 60 amostras de saliva, coletada de 20 crianças com idades variando de 6 a 11 anos, de ambos os sexos, com boa higiene bucal e com presença de mordida aberta anterior, que passaram por procedimentos odontológicos para correção das mesmas. Essas amostras foram coletadas de forma não estimulada em frasco de vidro âmbar e imediatamente colocada em gelo, em seguida as amostras foram armazenadas a -80 °C até o momento da análise.

As amostras utilizadas nesse trabalho correspondem a três tempos distintos do procedimento odontológico para correção de mordida aberta anterior utilizando esporões. Amostras de saliva foram coletadas antes da colagem dos esporões com adesivo odontológico, trinta minutos e vinte e quatro horas após o procedimento de colagem dos esporões.

Os dados obtidos passaram pelo Teste de Grubbs para a identificação de *outlier*. A Tabela 7 apresenta as concentrações de ftalatos e BPA em $\mu\text{g L}^{-1}$ dividido em três grupos: antes do procedimento, 30 minutos e 24 horas após o procedimento odontológico.

Tabela 7 - Concentração dos ftalatos e bisfenol A nas amostras de saliva coletadas antes do procedimento odontológico, 30 minutos e 24 horas após o procedimento odontológico.

Amostras	Concentrações de ftalatos e BPA em saliva ($\mu\text{g L}^{-1}$)														
	Antes					30 min					24 h				
	DMP	DEP	DiBP	DBP	BPA	DMP	DEP	DiBP	DBP	BPA	DMP	DEP	DiBP	DBP	BPA
1	-	-	-	-	0,40	-	-	-	-	10,18	-	-	-	-	-
2	-	-	-	3,26	2,86	-	-	-	-	0,35	-	-	-	-	0,87
4	-	-	-	-	0,36	-	-	7,31	-	10,15	-	-	-	4,74	0,74
5	-	-	-	-	0,56	-	-	-	-	4,55	-	-	-	-	-
6	-	-	2,25	-	-	-	-	18,14	8,51	0,71	-	-	11,06	6,01	0,69
7	-	-	2,92	6,19	0,60	-	-	42,85	10,32	0,72	-	-	-	-	0,39
8	-	-	27,48	13,07	0,68	-	-	-	-	0,49	-	-	-	-	0,40
9	-	-	-	-	-	-	-	28,91	13,34	5,87	-	-	20,83	3,61	0,57
10	-	-	24,52	7,20	1,83	-	-	34,43	13,30	0,58	-	-	-	-	-
12	-	-	35,9	16,15	2,21	-	-	27,61	9,23	1,34	-	-	-	14,50	1,70
13	-	-	34,44	12,27	1,23	-	-	-	-	-	-	-	31,51	10,21	0,83
14	-	-	17,77	6,00	1,01	-	-	-	-	0,70	-	-	16,77	-	0,60
15	-	-	21,19	8,21	1,18	-	-	-	-	4,38	-	-	-	-	-
16	-	-	3,95	-	1,47	-	-	-	15,35	0,42	-	-	3,59	2,46	0,61
17	-	-	19,39	8,46	-	-	-	12,60	3,97	0,35	-	-	8,65	5,95	-
18	-	-	23,94	7,10	3,09	-	-	7,75	2,74	0,35	-	-	7,04	3,30	0,38
19	-	-	-	13,76	-	-	-	13,62	4,42	0,70	-	-	10,25	5,80	1,46
20	-	-	9,51	4,48	-	-	-	15,49	7,68	0,88	-	-	7,98	4,47	-
21	-	-	8,96	6,25	-	-	-	35,35	12,31	-	-	-	15,61	8,38	-
22	-	-	13,66	4,02	0,61	-	-	9,32	5,64	-	-	-	20,68	6,56	-

- :concentrações detectadas abaixo dos LOD

Os resultados obtidos, demonstram que os analitos DiBP e DBP estavam presentes em maior concentração em todos os tempos analisados. A maior concentração de DiBP ($42,85 \mu\text{g L}^{-1}$) e BPA ($10,21 \mu\text{g L}^{-1}$) foi encontrada em amostras coletadas 30 minutos após a colagem dos esporões. Enquanto para DBP, a maior concentração foi detectada em amostrada coletadas antes do procedimento odontológico.

Nas amostras estudadas não foram detectados os analitos DMP e DEP. A ausência desses analitos na amostra pode ser resultado da não utilização desses compostos na formulação do material utilizado no procedimento odontológico. Embora essas hipóteses seja possível, ela contradiz o trabalho de Bationo et al. (2016) que detectaram a migração de DEP de duas marcas de adesivo ortodôntico Transbond XT e Blugloo para água. Em outro trabalho, DMP e DEP foram detectados e quantificados na saliva tanto do grupo de estudo (pessoas com alteração na cavidade oral) como do grupo de controle (pessoas sem nenhuma alteração na cavidade oral) (Gomes et al., 2020).

Outra hipótese é que esses analitos foram rapidamente metabolizados por enzimas presentes na saliva. Silva et al.,(2005) determinaram que enzimas presentes na saliva podem hidrolisar ftalatos aos seus respectivos monoesteres a uma taxa de até 12 % após 90 minutos de incubação a 37°C . Para reduzir a hidrolise dos ftalatos os autores propõem o uso de ácido fosfórico para desnaturar as enzimas presentes na saliva (Silva et al., 2005). Nas amostras coletadas, a adição de ácido fosfórico foi realizada durante o preparo da amostra e não após a coleta das amostras, o que corrobora para a possibilidade de metabolização dos analitos durante o armazenamento.

A Figura 13 relaciona as concentrações do analitos estudados nas vintes amostras de saliva coletadas em cada tempo. Nessa figura, foi possível observar que o DiBP estava presente em concentração elevada em todos os tempos estudados, enquanto o BPA apresentou menor concentração quando comparado com os demais analitos nos mesmos tempos. A concentração de DiBP, DBP e BPA aumentou 30 minutos após o procedimento odontológico, apesar do número de amostras que detectaram esse aumento ser menor. Observou-se ainda que 24 horas depois do procedimento as concentrações de todos analitos diminuiram, com uma diminuição mais acentuada para o BPA.

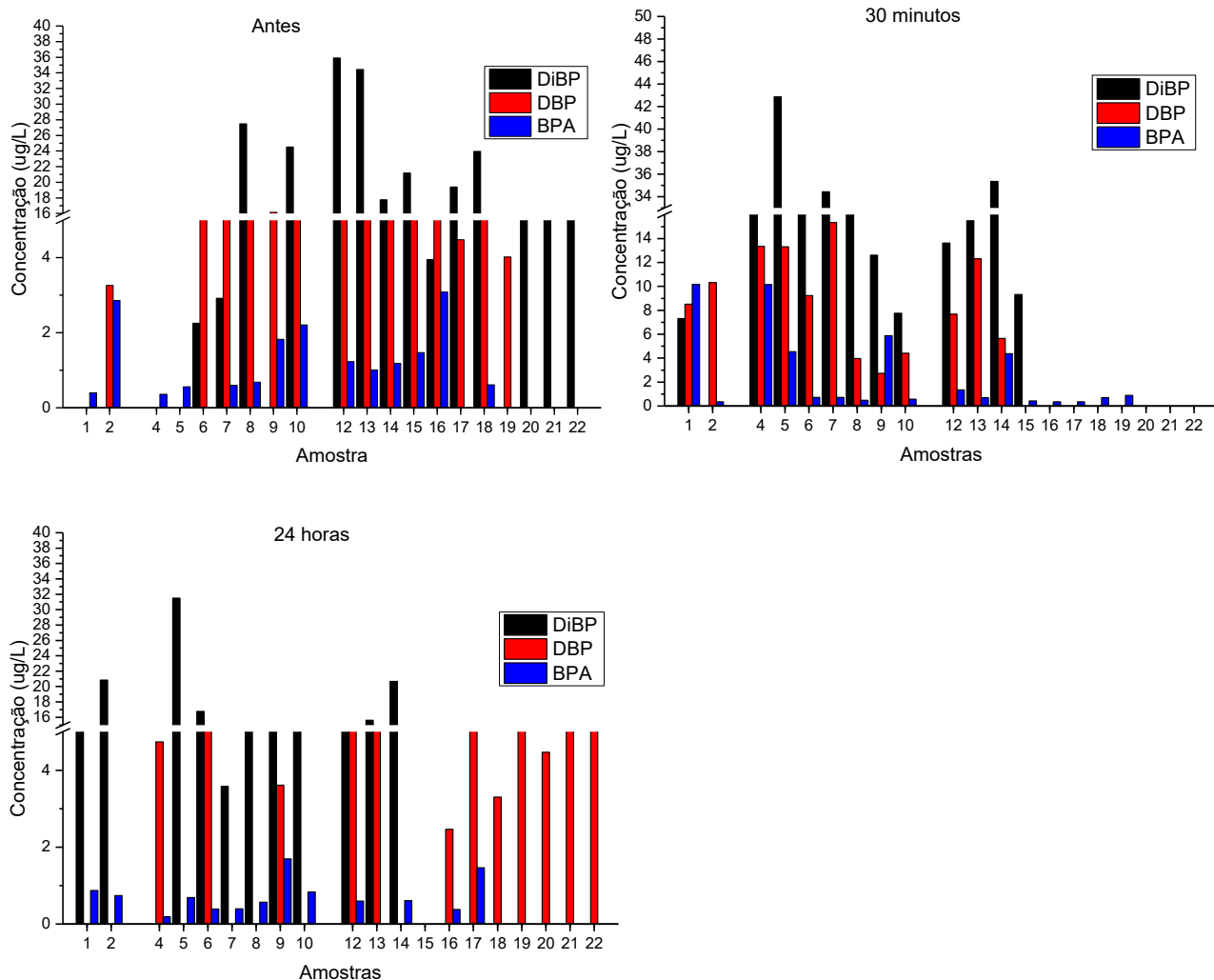


Figura 13 - Relação entre as concentrações de DiBP, DBP e BPA antes do procedimento odontológico, trinta minutos e vinte quatro horas após o procedimento odontológico.

O teste ANOVA pareado, com 95% de confiança, foi utilizado para avaliar as diferenças obtidas para cada analito nos três tempos de amostragem. Este teste revelou que houve diferenças significativas ($p < 0,06$) entre as concentrações médias dos analitos DiBP e BPA nos tempos analisados. Na Figura 14 estão apresentadas as médias de concentração e a comparação entre essas médias pelo teste de Tukey para DiBP e BPA, respectivamente.

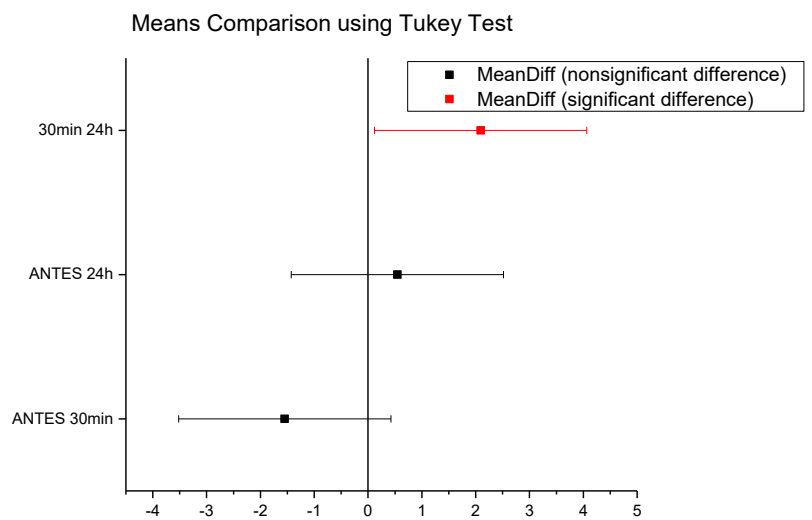
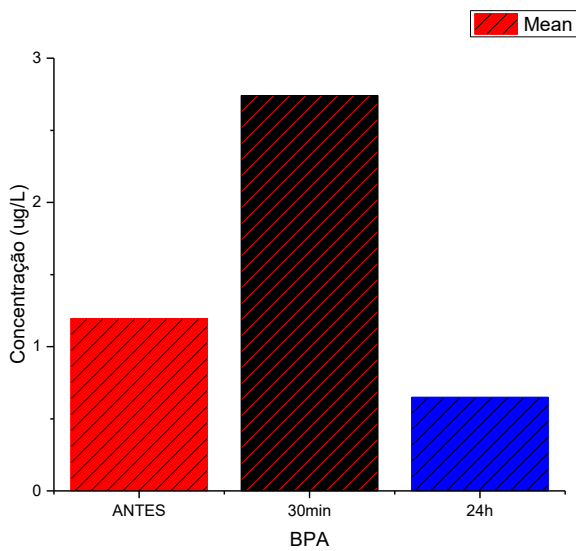
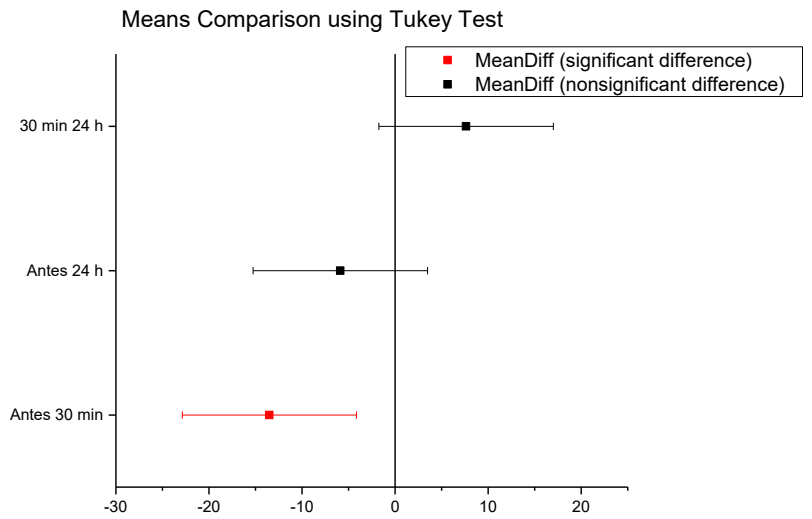
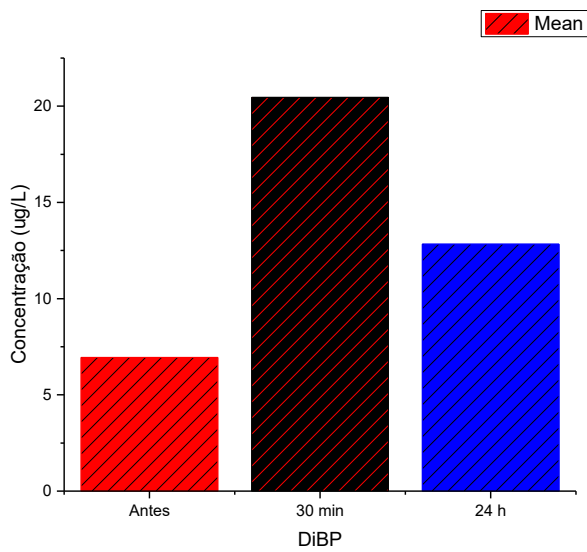


Figura 14 - Média e comparação entre as médias utilizando o teste de Tukey para DiBP (superior) e BPA (inferior) para amostras de salivas coletadas antes do procedimento odontológico, trinta minutos e vinte quatro horas após a realização do procedimento odontológico.

Para o DiBP, diferenças significativas foram encontradas entre amostras coletadas antes e trinta minutos após o procedimento odontológico. Enquanto o BPA

apresentou diferenças significativas entre amostras de saliva coletadas trinta minutos e vinte quatro horas após o procedimento odontológico.

Os elevados valores observados para DiBP e DBP podem estar associados ao material colante utilizado em procedimentos odontológicos, mas outras fontes também podem influenciar na concentração desses compostos. Fontes de DiBP e DBP incluem muitos materiais como embalagens de alimentos, cosméticos, produtos de cuidados pessoais e até mesmos materiais particulados presente no ar que podem ser ingeridos (Wormuth et al., 2006).

Uma análise de componentes principais (*Principal Component Analysis – PCA*) foi realizada utilizando o software Statistica versão 10 (Palo Alto, USA). As amostras e as concentrações dos analitos foram organizadas em uma matriz de 60 linhas e 3 colunas. Dois componentes principais (PC1 e PC2) explicaram 77,5% da variância total. Os gráficos de score e loading são apresentados na Figuras 15.

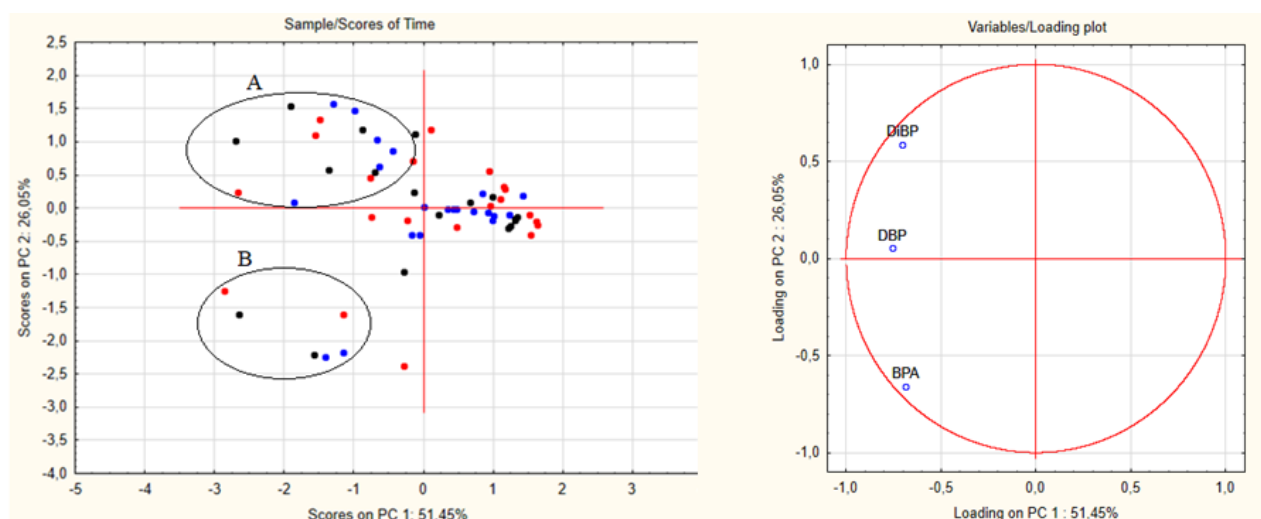


Figura 15 - Gráfico de scores e de loading dos tempos estudados: Antes do procedimento odontológico (vermelho), 30 minutos (preto) e 24 horas depois do procedimento odontológico (azul).

Ao analisar a Figura 15, observa-se a formação de dois agrupamentos principais (A e B) com separação em PC2. Entretanto ambos os grupos são formados por amostras coletadas nos diferentes tempos estudados: antes do procedimento odontológico (vermelho), 30 minutos após o procedimento odontológico (preto) e 24 horas após (azul). A análise do gráfico de loading, juntamente com o gráfico dos scores permite correlacionar as variáveis DiBP, DBP e BPA com os grupos indicados. As variáveis

DBP, DiBP estão presentes em níveis mais elevados nas amostras que pertencem ao grupo A, enquanto BPA está em níveis menores nas amostras que formam o grupo B.

Estudos que avaliam a migração de ftalatos e BPA de materiais utilizados em procedimento odontológicos para a saliva são escassos (Moreira et al., 2017). Lee et al. (2017) avaliaram a variação na concentração de BPA em saliva devido a procedimentos odontológicos de restauração empregando resina composta, os autores observaram um aumento na concentração de BPA ($3,64 \mu\text{g L}^{-1}$) após o emprego de resina composta, depois de sete dias essa concentração caiu para $0,59 \mu\text{g L}^{-1}$. Em outro estudo, Vu et al. (2020), quantificaram 15 desreguladores endócrinos em saliva, extraído por DLLME e analisado por GC-MS, os autores quantificaram dois bisfenóis (BPA: $0,02 - 0,27 \mu\text{g L}^{-1}$ e BPF: $0,05 - 1,67$) e quatro metabolitos de ftalatos (MBzP: $4,95 - 25,9 \mu\text{g L}^{-1}$; MEOHP: $7,36 - 13,2 \mu\text{g L}^{-1}$; MEHP: $0,09 - 5,27 \mu\text{g L}^{-1}$; MBP: $0,00 - 1,71 \mu\text{g L}^{-1}$).

Utilizando as concentrações de ftalatos e BPA obtidas, foi possível fazer uma Estimativa do Consumo Diário (ECD) desses compostos para cada analito nos diferentes tempos de análise e comparar com os TDI estabelecidos pela EFSA (Rocha et al., 2017). Essa estimativa leva em consideração a concentração do analito na saliva, a produção média de saliva, e o peso médio do indivíduo.

$$\text{ECD} = \frac{\text{Concentração estimata do analito x Volume medio de saliva}}{\text{Peso médio do individuo}}$$

O volume médio de saliva produzido pode variar de 500 – 2500 mL por dia (Michalke et al., 2014). Para o cálculo da ECD foi considerado o volume médio de saliva 1000 mL e por se tratar de crianças, assumiu-se o peso médio de 20 kg. A Tabela 8, apresenta os valores da ECD para os analitos estudados.

Tabela 8 - Valores estimados de consumo diário (ECD) para os ftalatos e BPA detectados nesses estudos.

Tempo	Compostos					
	DiBP		DBP		BPA	
	Média ($\mu\text{g kg}^{-1} \text{d}^{-1}$)	Desvio ($\mu\text{g kg}^{-1} \text{d}^{-1}$)	Média ($\mu\text{g kg}^{-1} \text{d}^{-1}$)	Desvio ($\mu\text{g kg}^{-1} \text{d}^{-1}$)	Média ($\mu\text{g kg}^{-1} \text{d}^{-1}$)	Desvio ($\mu\text{g kg}^{-1} \text{d}^{-1}$)
Antes	0,88	0,54	0,42	0,19	0,06	0,04
30 minutos	1,06	0,19	0,45	0,20	0,13	0,16
24 horas	0,70	0,39	0,32	0,16	0,04	0,02

Segundo a EFSA o TDI para os compostos DiBP, DBP e BPA são 10, 10 e 4 $\mu\text{g kg}^{-1} \text{d}^{-1}$, respectivamente (EFSA, 2005, 2015). Baseado nesses valores e os dados da Tabela 8, observa-se que nenhum dos analitos detectados nesse trabalho apresentou valores de ECD acima dos valores de TDI. Portanto, os valores dos analitos estão bem abaixo dos valores de TDI, indicando que a migração desses compostos está em níveis aceitáveis.

5 Conclusão

O método aperfeiçoado e validado para a análise de ftalatos e BPA em saliva utilizou quantidades mínimas de solvente e apresentou baixos limites de detecção e quantificação, quando comparado com outros trabalhos disponíveis na literatura. Ademais apresentou bom desempenho para os parâmetros seletividade, linearidade e precisão.

O método HF-LPME-GC/MS validado foi aplicado para análise de sessenta amostras reais de saliva coletadas de vinte pacientes submetidos a tratamentos odontológicos. Os compostos DMP e DEP não foram detectados em nenhuma amostra analisada, esse fato é contrastante com outros trabalhos que buscaram analisar ftalatos em saliva.

O teste ANOVA revelou que houve diferenças significativas nas concentrações dos analitos DiBP e BPA. Para o DiBP amostras coletadas antes e trinta minutos após o procedimento odontológico foram estaticamente diferentes, enquanto o BPA apresentou diferenças significativas entre amostras coletadas trinta minutos e vinte quatro horas após o procedimento odontológico. Esses resultados podem indicar que o processo de migração é o principal responsável pelo aumento na concentração desses compostos após o procedimento odontológico.

Na PCA não houve separação das amostras coletadas nos diferentes tempos estudados. Embora tenha ocorrido a formação de dois agrupamentos em PC2, estes resultados indicam ausência de variações significativas nas concentrações dos plastificantes na saliva. Entretanto a migração desses componentes dos materiais empregados em procedimentos odontológicos não pode ser descartada, uma vez que problemas relacionados ao armazenamento das amostras e decomposição enzimática dos ftalatos, podem ter ocorrido.

Em todas as amostras analisadas os valores de ECD estavam abaixo dos TDI estabelecidos pela EFSA, indicando que a migração desses compostos ocorreu em níveis aceitáveis e seguros.

O método HLPME para extração de plastificantes em saliva é simples, de baixo custo e a coleta de saliva é um processo não invasivo quando comparado com matrizes como sangue e urina. Além disso, o método mostrou-se adequado para estudos relacionados a migração de DEs de materiais odontológicos. Como perspectiva este método poderá ter seu escopo ampliado para biomonitorar outras classes de compostos tóxicos na saliva.

6 Referências

Abraham, A., Chakraborty, P., 2019. A review on sources and health impacts of bisphenol A. *Rev. Environ. Health*. <https://doi.org/10.1515/reveh-2019-0034>

Akash, M.S.H., Sabir, S., Rehman, K., 2020. Bisphenol A-induced metabolic disorders: From exposure to mechanism of action. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 77, 103373. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103373>

Akgül, S., Sur, Ü., Düzçeker, Y., Balcı, A., Kızıllkan, M.P., Kanbur, N., Bozdağ, G.,

- Erkekoğlu, P., Gümüş, E., Kocer-Gumusel, B., Derman, O., 2019. Bisphenol A and phthalate levels in adolescents with polycystic ovary syndrome. *Gynecol. Endocrinol.* 35, 1084–1087. <https://doi.org/10.1080/09513590.2019.1630608>
- Al-Natsheh, M., Alawi, M., Fayyad, M., Tarawneh, I., 2015. Simultaneous GC-MS determination of eight phthalates in total and migrated portions of plasticized polymeric toys and childcare articles. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 985, 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.01.010>
- Amin, M.M., Ebrahim, K., Poursafa, P., 2017. Development of a dispersive liquid–liquid microextraction (DLLME) method coupled with GC/MS as a simple and valid method for simultaneous determination of phthalate metabolites in plasma. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 97, 1362–1377. <https://doi.org/10.1080/03067319.2017.1422497>
- ANVISA, 2016. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA – RDC N° 27 , DE 17 DE MAIO. Ministério da Saúde - Agência Nac. Vigilância Sanitária.
- ANVISA, 2008. Resolução De Diretoria Colegiada - Rdc N° 17, De 17 De Março De 2008.
- Baird, C., 2012. ENVIRONMENTAL CHEMISTRY Fifth Edition Colin, W. H. Freeman and Company.
- Bationo, R., Jordana, F., Boileau, M.J., Colat-Parros, J., 2016. Release of monomers from orthodontic adhesives. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* 150, 491–498. <https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2016.02.027>
- Berger, K., Eskenazi, B., Kogut, K., Parra, K., Lustig, R.H., Greenspan, L.C., Holland, N., Calafat, A.M., Ye, X., Harley, K.G., 2018. Association of prenatal urinary concentrations of phthalates and bisphenol a and pubertal timing in boys and girls. *Environ. Health Perspect.* 126. <https://doi.org/10.1289/EHP3424>
- Bernardo, P.E.M., Navas, S.A., Tieco, L., Murata, F., Alcântara, M.R. da S., 2015. Bisphenol A: Review on its use in the food packaging, exposure and toxicity. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 74, 1–11.
- Bodaghi, A., 2019. An overview on the recent developments in reactive plasticizers in polymers. *Polym. Adv. Technol.* 355–367. <https://doi.org/10.1002/pat.4790>

- Casals-Casas, C., Desvergne, B., 2011. Endocrine Disruptors: From Endocrine to Metabolic Disruption. *Annu. Rev. Physiol.* 73, 135–162. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-012110-142200>
- Cerqueira, G.D., 2018. Determinação de plastificantes e seus metabólitos em urina e saliva por HF-LPME-GC/MS para estudos de exposição odontológica. Universidade Federal de Minas Gerais.
- Davis, R.L., Curtis, K.S., 2020. Estrogen disruptors and neuroimmune signaling in obesity: focus on bisphenol A. *Curr. Opin. Toxicol.* 19, 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2019.09.006>
- Drozd, K., Wysokinski, D., Krupa, R., Wozniak, K., 2011. Bisphenol A-glycidyl methacrylate induces a broad spectrum of DNA damage in human lymphocytes. *Arch. Toxicol.* 85, 1453–1461. <https://doi.org/10.1007/s00204-010-0593-x>
- EFSA, 2005. Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) related to di-Butylphthalate (DBP) for use in food contact materials. *EFSA J.* 3. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2005.242>
- EFSA, 2015. Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs. *EFSA J.* 13. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.3978>
- Emfietzoglou, R., Spyrou, N., Mantzoros, C.S., Dalamaga, M., 2019. Could the endocrine disruptor bisphenol-A be implicated in the pathogenesis of oral and oropharyngeal cancer? Metabolic considerations and future directions. *Metabolism.* 91, 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.11.007>
- EPA, 2012. -pentyl phthalate (DnPP), di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), di-. U.S. Environ. Prot. Agency 1–16.
- Esfafili, A., Baharfar, M., Tajik, M., Yamini, Y., Ghambarian, M., 2018. Two-phase hollow fiber liquid-phase microextraction. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 108, 314–322. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.09.015>
- European Commission, 2018. Commission Regulation 2018/2005 of 17 December 2018 amending Annex XVII to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and

Restriction of Chemicals (REACH). Off. J. Eur. Union 6, L 322/14-L 322/19.

Fan, Y.L., Ma, M., Cui, H.Z., Liu, S., Yang, M.L., Hou, X.F., 2018. Simultaneous determination of 22 phthalate esters in polystyrene food-contact materials by ultra-performance convergence chromatography with tandem mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* 41, 2993–3002. <https://doi.org/10.1002/jssc.201800094>

Farajzadeh, M.A., Nouri, N., Khorram, P., 2014. Derivatization and microextraction methods for determination of organic compounds by gas chromatography. *TrAC - Trends Anal. Chem.* <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.11.006>

Fasano, E., Cirillo, T., 2018. Plasticizers and Bisphenol as Food Contaminants: Sources and Human Risk. *Curr. Anal. Chem.* 14, 296–305. <https://doi.org/10.2174/1573411013666170822153906>

Ferguson, K.K., McElrath, T.F., Cantonwine, D.E., Mukherjee, B., Meeker, J.D., 2015. Phthalate metabolites and bisphenol-A in association with circulating angiogenic biomarkers across pregnancy. *Placenta* 36, 699–703. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2015.04.002>

Fernández, M.A., Gómara, B., González, M.J., 2006. Occurrence of Phthalates and Their Metabolites in the Environment and Human Health Implications, in: *Handbook of Environmental Chemistry*. pp. 307–336. <https://doi.org/10.1007/698>

Fernandez, M.A.M., André, L.C., Cardeal, Z. de L., 2017. Hollow fiber liquid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry method to analyze bisphenol A and other plasticizer metabolites. *J. Chromatogr. A* 1481, 31–36. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.12.043>

Fisher, M., Arbuckle, T.E., MacPherson, S., Braun, J.M., Feeley, M., Gaudreau, É., 2019. Phthalate and BPA Exposure in Women and Newborns through Personal Care Product Use and Food Packaging. *Environ. Sci. Technol.* 53, 10813–10826. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b02372>

Galloway, T.S., Lee, B.P., Burić, I., Steele, A.M., Kocur, A.L., Pandeth, A.G., Harries, L.W., 2019. Plastics Additives and Human Health: A Case Study of Bisphenol A (BPA). *Issues Environ. Sci. Technol.* <https://doi.org/10.1039/9781788013314-00131>

Geens, T., Aerts, D., Berthot, C., Bourguignon, J.P., Goeyens, L., Lecomte, P., Maghuin-Rogister, G., Pironnet, A.M., Pussemier, L., Scippo, M.L., Van Loco, J., Covaci, A., 2012. A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A. *Food Chem. Toxicol.* 50, 3725–3740. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.07.059>

Geens, T., Goeyens, L., Covaci, A., 2011. Are potential sources for human exposure to bisphenol-A overlooked? *Int. J. Hyg. Environ. Health* 214, 339–347. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.04.005>

Geyer, R., Jambeck, J.R., Law, K.L., 2017. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Sci. Adv.* 3. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782>

Gjelstad, A., 2019. Three-phase hollow fiber liquid-phase microextraction and parallel artificial liquid membrane extraction. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 113, 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.01.007>

Gomes, J.M., Almeida, T.F.A., da Silva, T.A., de Lourdes Cardeal, Z., Menezes, H.C., 2020. Saliva biomonitoring using LPME-GC/MS method to assess dentistry exposure to plasticizers. *Anal. Bioanal. Chem.* 1–12. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02908-x>

Grohs, M.N., Reynolds, J.E., Liu, J., Martin, J.W., Pollock, T., Lebel, C., Dewey, D., Kaplan, B.J., Field, C.J., Bell, R.C., Bernier, F.P., Cantell, M., Casey, L.M., Eliasziw, M., Farmer, A., Gagnon, L., Giesbrecht, G.F., Goonewardene, L., Johnston, D.W., Kooistra, L., Letourneau, N., Manca, D.P., McCargar, L.J., O’Beirne, M., Pop, V.J., Singhal, N., 2019. Prenatal maternal and childhood bisphenol a exposure and brain structure and behavior of young children. *Environ. Heal. A Glob. Access Sci. Source* 18. <https://doi.org/10.1186/s12940-019-0528-9>

Halden, R.U., 2010. Plastics and Health Risks. *Annu. Rev. Public Health* 31, 179–194. <https://doi.org/10.1146/annurev.publhealth.012809.103714>

Haned, Z., Moulay, S., Lacorte, S., 2018. Migration of plasticizers from poly(vinyl chloride) and multilayer infusion bags using selective extraction and GC–MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 156, 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.04.011>

Hatch, E.E., Nelson, J.W., Stahlhut, R.W., Webster, T.F., 2010. Association of endocrine disruptors and obesity: Perspectives from epidemiological studies. *Int. J. Androl.* 33, 324–332. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2009.01035.x>

He, Y., 2012. Liquid-based microextraction techniques for environmental analysis, in: *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*. Elsevier Inc., pp. 835–862. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381373-2.00116-2>

Heise, S., Litz, N., 2004. Deskstudy PHTHALATES 41.

IHS Markit, 2018. *Chemical Economics Handbook*.

INMETRO, 2007. Portaria n.º 369, de 27 de setembro de 2007.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2015. Pesquisa nacional de saúde 2013. Acesso e utilização dos serviços de saúde, acidentes e violências : Brasil, grandes regiões e unidades da federação, Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2209. <https://doi.org/ISSN 0101-4234>

Jiang, J.T., Sun, W.L., Jing, Y.F., Liu, S.B., Ma, Z., Hong, Y., Ma, L., Qin, C., Liu, Q., Stratton, H.J., Xia, S.J., 2011. Prenatal exposure to di-n-butyl phthalate induces anorectal malformations in male rat offspring. *Toxicology* 290, 322–326. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.10.008>

Kang, J.H., Kondo, F., Katayama, Y., 2006. Human exposure to bisphenol A. *Toxicology* 226, 79–89. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.06.009>

Katsikantami, I., Sifakis, S., Tzatzarakis, M.N., Vakonaki, E., Kalantzi, O.I., Tsatsakis, A.M., Rizos, A.K., 2016. A global assessment of phthalates burden and related links to health effects. *Environ. Int.* 97, 212–236. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.09.013>

Kim, M.J., Park, Y.J., 2019. Bisphenols and thyroid hormone. *Endocrinol. Metab.* 34, 340–348. <https://doi.org/10.3803/EnM.2019.34.4.340>

Kokosa, J.M., 2019. Selecting an extraction solvent for a greener liquid phase microextraction (LPME) mode-based analytical method. *TrAC Trends Anal. Chem.* 118, 238–247. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.05.012>

Konieczna, A., Rutkowska, A., Rachoń, D., 2015. Health risk of exposure to Bisphenol A (BPA). *Rocz. Państwowego Zakładu Hig.* 66, 5–11.

Koppen, G., Govarts, E., Vanermen, G., Voorspoels, S., Govindan, M., Dewolf, M.C., Den Hond, E., Biot, P., Casteleyn, L., Kolossa-Gehring, M., Schwedler, G., Angerer, J.,

Koch, H.M., Schindler, B.K., Castaño, A., López, M.E., Sepai, O., Exley, K., Bloemen, L., Knudsen, L.E., Joas, R., Joas, A., Schoeters, G., Covaci, A., 2019. Mothers and children are related, even in exposure to chemicals present in common consumer products. *Environ. Res.* 175, 297–307. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.05.023>

Krishnan, A. V., Stathis, P., Permuth, S.F., Tokes, L., Feldman, D., 1993. Bisphenol-a: An estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* 132, 2279–2286. <https://doi.org/10.1210/endo.132.6.8504731>

Lee, J.H., Yi, S.K., Kim, S.Y., Kim, J.S., Son, S.A., Jeong, S.H., Kim, J.B., 2017. Salivary bisphenol A levels and their association with composite resin restoration. *Chemosphere* 172, 46–51. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.123>

Li, A.J., Martinez-Moral, M.-P., Al-Malki, A.L., Al-Ghamdi, M.A., Al-Bazi, M.M., Kumosani, T.A., Kannan, K., 2019. Mediation analysis for the relationship between urinary phthalate metabolites and type 2 diabetes via oxidative stress in a population in Jeddah, Saudi Arabia. *Environ. Int.* 126, 153–161. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.01.082>

Li, H.L., Ma, W.L., Liu, L.Y., Zhang, Z., Sverko, E., Zhang, Z.F., Song, W.W., Sun, Y., Li, Y.F., 2019. Phthalates in infant cotton clothing: Occurrence and implications for human exposure. *Sci. Total Environ.* 683, 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.132>

MacLeod, D.J., Sharpe, R.M., Welsh, M., Fiskens, M., Scott, H.M., Hutchison, G.R., Drake, A.J., Van Den Driesche, S., 2010. Androgen action in the masculinization programming window and development of male reproductive organs. *Int. J. Androl.* 33, 279–287. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2009.01005.x>

Magnusson, B., Örnemark, U. (Eds.), 2014. *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, 2nd ed.

Michalke, B., Rossbach, B., Göen, T., Schäferhenrich, A., Scherer, G., 2014. Saliva as a matrix for human biomonitoring in occupational and environmental medicine. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 88, 1–44. <https://doi.org/10.1007/s00420-014-0938-5>

Moreira, M.R., Matos, L.G., de Souza, I.D., Brigante, T.A.V., Queiroz, M.E.C.,

- Romano, F.L., Nelson-Filho, P., Matsumoto, M.A.N., 2017. Bisphenol A release from orthodontic adhesives measured in vitro and in vivo with gas chromatography. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* 151, 477–483. <https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2016.07.019>
- Moura, H.S.R.P., Rocha, P.R.S., Amato, A.A., Sodr e, F.F., 2020. Quantification of bisphenol A in urine samples from children studying in public schools from the Brazilian Capital. *Microchem. J.* 152. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104347>
- Oliveira, A.R.M. de, Magalhães, I.R.D.S., Santana, F.J.M. de, Bonato, P.S., 2008. Microextração em fase líquida (LPME): Fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. *Quim. Nova* 31, 637–644.
- Özer, E.T., Güçer, Ş., 2011. Determination of some phthalate acid esters in artificial saliva by gas chromatography-mass spectrometry after activated carbon enrichment. *Talanta* 84, 362–367. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.01.003>
- Parkinson, D.R., 2012. Analytical derivatization techniques, in: *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*. Elsevier Inc., pp. 559–595. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381373-2.00060-0>
- Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K.E., 2008. Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid-liquid extraction. *J. Chromatogr. A* 1184, 132–142. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.08.088>
- Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K.E., 1999. Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* 71, 2650–2656. <https://doi.org/10.1021/ac990055n>
- Pratap, B., Gupta, R.K., Bhardwaj, B., Nag, M., 2019. Resin based restorative dental materials: characteristics and future perspectives. *Jpn. Dent. Sci. Rev.* 55, 126–138. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2019.09.004>
- Radke, E.G., Galizia, A., Thayer, K.A., Cooper, G.S., 2019. Phthalate exposure and metabolic effects: a systematic review of the human epidemiological evidence. *Environ. Int.* 132, 104768. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.04.040>
- Reyes-Garcés, N., Gionfriddo, E., 2019. Recent developments and applications of solid

phase microextraction as a sample preparation approach for mass-spectrometry-based metabolomics and lipidomics. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 113, 172–181. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.01.009>

Ribeiro, E., Ladeira, C., Viegas, S., 2017. EDCs Mixtures: A Stealthy Hazard for Human Health? *Toxics* 5, 5. <https://doi.org/10.3390/toxics5010005>

Robinson, L., Miller, R., 2015. The Impact of Bisphenol A and Phthalates on Allergy, Asthma, and Immune Function: a Review of Latest Findings. *Curr. Environ. Heal. reports.* <https://doi.org/10.1007/s40572-015-0066-8>

Rocha, B.A., Asimakopoulos, A.G., Barbosa, F., Kannan, K., 2017. Urinary concentrations of 25 phthalate metabolites in Brazilian children and their association with oxidative DNA damage. *Sci. Total Environ.* 586, 152–162. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.193>

Rogers, J.A., Metz, L., Yong, V.W., 2013. Review: Endocrine disrupting chemicals and immune responses: A focus on bisphenol-A and its potential mechanisms. *Mol. Immunol.* 53, 421–430. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.09.013>

Russo, G., Barbato, F., Mita, D.G., Grumetto, L., 2019. Simultaneous determination of fifteen multiclass organic pollutants in human saliva and serum by liquid chromatography–tandem ultraviolet/fluorescence detection: A validated method. *Biomed. Chromatogr.* 33. <https://doi.org/10.1002/bmc.4427>

Russo, M.V., Avino, P., Notardonato, I., 2016. Fast analysis of phthalates in freeze-dried baby foods by ultrasound-vortex-assisted liquid-liquid microextraction coupled with gas chromatography-ion trap/mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1474, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.10.058>

Sampaolese, B., Lupi, A., Di Stasio, E., Martorana, G.E., Gambarini, G., Giardina, B., Nocca, G., 2011. Inhibition of telomerase activity in HL-60 cell line by methacrylic monomers. *Dent. Compos.* 157–170.

Shafei, A., Ramzy, M.M., Hegazy, A.I., Husseny, A.K., EL-hadary, U.G., Taha, M.M., Mosa, A.A., 2018. The molecular mechanisms of action of the endocrine disrupting chemical bisphenol A in the development of cancer. *Gene* 647, 235–243. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.01.016>

- Shoshtari-Yeganeh, B., Zarean, M., Mansourian, M., Riahi, R., Poursafa, P., Teiri, H., Rafiei, N., Dehdashti, B., Kelishadi, R., 2019. Systematic review and meta-analysis on the association between phthalates exposure and insulin resistance. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26, 9435–9442. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04373-1>
- Sicińska, P., 2019. Di-n-butyl phthalate, butylbenzyl phthalate, and their metabolites exhibit different apoptotic potential in human peripheral blood mononuclear cells. *Food Chem. Toxicol.* 133. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110750>
- Silva, M.J., Reidy, J.A., Samandar, E., Herbert, A.R., Needham, L.L., Calafat, A.M., 2005. Detection of phthalate metabolites in human saliva. *Arch. Toxicol.* 79, 647–652. <https://doi.org/10.1007/s00204-005-0674-4>
- Sobhi, H.R., Behbahani, M., Ghambarian, M., Salimi, M., Esrafil, A., 2019. Extraction of carbonyl derivatives from ozonated wastewater samples using hollow fiber liquid phase microextraction followed by gas chromatography-electron capture detection. *Microchem. J.* 148, 331–337. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.05.020>
- Sun, Q., Cornelis, M.C., Townsend, M.K., Tobias, D.K., Heather Eliassen, A., Franke, A.A., Hauser, R., Hu, F.B., 2014. Association of urinary concentrations of bisphenol A and phthalate metabolites with risk of type 2 diabetes: A prospective investigation in the nurses' health study (NHS) and NHSII cohorts. *Environ. Health Perspect.* 122, 616–623. <https://doi.org/10.1289/ehp.1307201>
- Tarapore, P., Ying, J., Ouyang, B., Burke, B., Bracken, B., Ho, S.M., 2014. Exposure to bisphenol a correlates with early-onset prostate cancer and promotes centrosome amplification and anchorage-independent growth in vitro. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090332>
- Tranfo, G., Caporossi, L., Paci, E., Aragona, C., Romanzi, D., De Carolis, C., De Rosa, M., Capanna, S., Papaleo, B., Pera, A., 2012. Urinary phthalate monoesters concentration in couples with infertility problems. *Toxicol. Lett.* 213, 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.11.033>
- Trasande, L., Attina, T.M., 2015. Association of Exposure to Di-2-Ethylhexylphthalate Replacements With Increased Blood Pressure in Children and Adolescents. *Hypertension* 66, 301–308. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05603>

Tsochatzis, E.D., Tzimou-Tsitouridou, R., Gika, H.G., 2017. Analytical Methodologies for the Assessment of Phthalate Exposure in Humans. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 47, 279–297. <https://doi.org/10.1080/10408347.2016.1273754>

Vandenberg, L.N., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N., Welshons, W. V., 2007. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod. Toxicol.* <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.07.010>

Venson, R., Korb, A.S., Cooper, G., 2019. A review of the application of hollow-fiber liquid-phase microextraction in bioanalytical methods – A systematic approach with focus on forensic toxicology. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1108, 32–53. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.01.006>

Vilarinho, F., Sendón, R., van der Kellen, A., Vaz, M.F., Silva, A.S., 2019. Bisphenol A in food as a result of its migration from food packaging. *Trends Food Sci. Technol.* 91, 33–65. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.06.012>

Viñas, P., Campillo, N., Martínez-Castillo, N., Hernández-Córdoba, M., 2010. Comparison of two derivatization-based methods for solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometric determination of bisphenol A, bisphenol S and biphenol migrated from food cans. *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 115–125. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3464-7>

Vom Saal, F.S., Hughes, C., 2005. An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. *Environ. Health Perspect.* <https://doi.org/10.1289/ehp.7713>

Vu, T.H. Van, Lim, H.H., Shin, H.S., 2020. Determination of 15 Biomarkers of Endocrine Disrupting Chemicals in Human Saliva by Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Bull. Korean Chem. Soc.* 41, 424–432. <https://doi.org/10.1002/bkcs.11986>

Wade, M., Delawder, V., Reneau, P., dos Santos, J.M., 2020. The effect of BPA exposure on insulin resistance and type 2 diabetes – The impact of muscle contraction. *Med. Hypotheses* 140. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.109675>

Wang, Y.-X., Zeng, Q., Sun, Y., Yang, P., Wang, P., Li, J., Huang, Z., You, L., Huang, Y.-H., Wang, C., Li, Y.-F., Lu, W.-Q., 2016. Semen phthalate metabolites, semen

quality parameters and serum reproductive hormones: A cross-sectional study in China. *Environ. Pollut.* 211, 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.12.052>

Wetherill, Y.B., Fisher, N.L., Staubach, A., Danielsen, M., De Vere White, R.W., Knudsen, K.E., 2005. Xenoestrogen action in prostate cancer: Pleiotropic effects dependent on androgen receptor status. *Cancer Res.* 65, 54–65.

Wittassek, M., Angerer, J., 2008. Phthalates: metabolism and exposure. *Int. J. Androl.* 31, 131–138. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2007.00837.x>

Wormuth, M., Scheringer, M., Vollenweider, M., Hungerbühler, K., 2006. What are the sources of exposure to eight frequently used phthalic acid esters in Europeans? *Risk Anal.* 26, 803–824. <https://doi.org/10.1111/j.1539-6924.2006.00770.x>

Yamini, Y., Rezazadeh, M., Seidi, S., 2019. Liquid-phase microextraction – The different principles and configurations. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 112, 264–272. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.06.010>

Zhu, M., Huang, C., Ma, X., Wu, R., Zhu, W., Li, X., Liang, Z., Deng, F., Wu, J., Geng, S., Xie, C., Zhong, C., 2018. Phthalates promote prostate cancer cell proliferation through activation of ERK5 and p38. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 63, 29–33. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.08.007>

Zuccarello, P., Oliveri Conti, G., Cavallaro, F., Copat, C., Cristaldi, A., Fiore, M., Ferrante, M., 2018. Implication of dietary phthalates in breast cancer. A systematic review. *Food Chem. Toxicol.* 118, 667–674. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.06.011>