

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

Miriany Avelino Moreira

Desenvolvimento de Métodos Cromatográficos para
Análise de Plastificantes, Alquilfenóis e seus Metabólitos
em Alimentos e Urina

Belo Horizonte

2014

UFMG/ ICEx/ DQ 1049^a

T 477^a

Miriany Avelino Moreira

Desenvolvimento de Métodos Cromatográficos para Análise de
Plastificantes, Alquilfenóis e seus Metabólitos em Alimentos e
Urina

Tese apresentada ao
Departamento de Química
do Instituto de Ciências
Exatas da Universidade
Federal de Minas Gerais
como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutor
em Ciências- Química

Belo Horizonte

2014

M835d Moreira, Miriany Avelino
2014 Desenvolvimento de métodos cromatográficos para
T análise de plastificantes, alquilfenóis e seus
metabólitos em alimentos e urina [manuscrito] /
Miriany Avelino Moreira. 2014.
[xvi], 90 f. : il.

Orientadora: Zenilda de Lourdes Cardeal.
Coorientadora: Leiliane Coelho André.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas
Gerais - Departamento de Química.
Inclui bibliografia.

1. Química Analítica - Teses 2. Cromatografia de
gás - Teses 3. Alimentos - Análise - Teses 4. Fenóis -
Teses 5. Urina - Análise - Teses 6. Extração (Química)
- Teses I. Cardeal, Zenilda de Lourdes, Orientadora
II. André, Leiliane Coelho, Coorientadora III. Título.

CDU 043



**"Desenvolvimento de Métodos Cromatográficos para Análise de Plastificantes,
Alquilfenóis e seus Metabólitos em Alimentos e Urina"**

Miriany Avelino Moreira

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Profa. Zenilda de Lourdes Cardeal - Orientadora
UFMG

Profa. Leiliane Coelho André - Coorientadora
UFMG/Farmácia

Prof. Robson José de Cassia Franco Afonso
UFOP

Prof. William Weissmann
FIOCRUZ-RJ

Profa. Leticia Malta Costa
UFMG

Profa. Adriana Ferreira Faria
UFMG

Belo Horizonte, 19 de dezembro de 2014.

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus.

Muito, nos aproxima”

Louis Pasteur

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força e sustento em todos os momentos da minha vida e pela capacitação na realização deste projeto. “ Porque dEle, por Ele e para Ele são todas as coisas” Rm 11:36.

Às minhas orientadoras, Profa Dra. Zenilda Cardeal e Profa Dra Leiliane André, pela oportunidade, paciência e ensinamentos que foram fundamentais para o crescimento acadêmico adquirido.

Aos meus pais, Marcelo e Elizabete, e aos meus irmãos Wagner e Marcelo Júnio pelo apoio, esforço, amizade, amor e presença.

Ao Diego pelo amor, paciência, carinho e apoio

Aos meus familiares pelo apoio e carinho.

Aos professores do Departamento de Química /ICEX pelos ensinamentos, em especial ao prof. Dr. Helvécio Menezes pela amizade e colaboração.

Aos professores Dra Márcia Mendonça Carneiro da Faculdade de Medicina/UFMG, Dr Marco Diogo Richter Gomes e Dra Alexandra Ribeiro da Universidade Nova de Lisboa pela colaboração.

Aos colegas da Universidade Nova de Lisboa pela colaboração e amizade.

Aos meus amigos que compartilharam comigo todas as dificuldades e alegrias. Agradeço pela amizade e companheirismo que nunca faltaram.

Aos companheiros de laboratório Damiana, Bulé, Vanessa, Júlio, Michely, Cláudia, Júnia, Isabela, Marcos, Eliane, Lívia, Jéssica e Daiana pela amizade e preciosa ajuda.

Ao CNPq, Capes e projeto Electroacross pelo apoio financeiro.

RESUMO

Desreguladores endócrinos (*endocrine disrupting chemicals* - EDC) são substâncias que causam disfunção no sistema endócrino de homens e animais e estão presentes em muitos alimentos. Estes compostos são encontrados em baixas concentrações, portanto, técnicas analíticas com alta sensibilidade são requeridas para sua quantificação. Neste trabalho foram desenvolvidos métodos cromatográficos para análise de alquilfenóis e plastificantes, substâncias suspeitas de serem desreguladores endócrinos, em amostras de alimentos e seus metabólitos e bisfenol A em amostras de urina. Amostras de carne de frango, simulante de alimentos e vegetais foram analisadas em estudos de migração de plastificantes de recipientes plásticos para o alimento. Foram desenvolvidos e validados métodos de análise utilizando cromatografia gasosa e microextração em fase sólida. A análise da migração de plastificantes foi feita inicialmente para avaliar se o processo de aquecimento de recipientes plásticos em fornos domésticos com radiação micro-ondas causa a migração de plastificantes para o alimento. Um novo método empregando microextração em fase sólida com fibra resfriada por nitrogênio líquido (CF-SPME) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas foi desenvolvido e validado. Para avaliar a migração de plastificantes, recipientes plásticos novos e com prolongado tempo de uso foram preenchidos com água ultrapura (utilizada como simulante de alimentos) e aquecidos em um forno de micro-ondas doméstico em diferentes períodos de tempo e diferentes níveis de potência. O plastificante dibutilftalato foi encontrado nas amostras analisadas. Em geral, um aumento na migração foi observado em recipientes com prolongado tempo de uso quando submetidos à maiores tempos de aquecimento. A CF-SPME também foi utilizada para avaliar a migração de plastificantes para carne de frango assada em sacos plásticos quando esta foi submetida à aquecimento em forno convencional. As amostras de temperos, que são vendidas juntamente com os sacos plásticos, também foram avaliadas. Os plastificantes diisobutilfitalato e dibutilftalato foram encontrados em amostras de tempero e de carne de frango temperada. A análise de alquilfenóis e plastificantes também foi avaliada em vegetais comercializados congelados. Para tal, um método utilizando microextração em fase sólida e cromatografia a gás bidimensional abrangente com detector por ionização em chama (GCxGC-FID) foi

desenvolvido e validado. Os compostos foram analisados em amostras de cenoura, batata e milho. Os compostos tert-octilfenol, dibutilftalato e benzilbutilftalato foram encontrados em amostras de cenoura e o composto dibutilftalato foi encontrado em uma amostra de milho. A avaliação de plastificantes em alimentos mostrou as possíveis fontes de contaminação humana alimentar por estes compostos, mas não sua exposição. Para que a exposição aos plastificantes fosse avaliada, amostras biológicas foram analisadas. Os metabólitos de plastificantes e bisfenol A foram determinados em amostras de urina de mulheres. Foi desenvolvido e validado um método de análise de metabólitos de plastificantes e bisfenol A utilizando microextração em fase líquida e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Os metabólitos foram encontrados em diferentes concentrações nas amostras de urina. Um estudo de avaliação da relação entre plastificantes, bisfenol A e endometriose também foi feito. O estudo mostrou que não existe uma relação entre a concentração de metabólitos de plastificantes e bisfenol A em urina e a presença de endometriose em mulheres quando os metabólitos foram comparados com testes de comparação de mediana.

Palavras-chave: Alquilfenóis, Plastificantes, Cromatografia Gasosa, Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente, Microextração em Fase Sólida com Fibra Resfriada, Microextração em Fase Líquida

ABSTRACT

Development of Chromatographic Methods for Analysis of Plasticizers, Alkylphenols and its Metabolites in Food and Urine

Endocrine disrupting chemicals (EDC) are present in many foods, they are substances that produce endocrine dysfunction in men and animals. These compounds are found in very low concentrations, high sensitivity analytical techniques are required for their quantification. This work presents the development of chromatographic methods for analysis of alkylphenols and plasticizers in food and bisphenol A e plasticizers metabolites in urine samples. Samples of chicken, vegetables and food simulants were analyzed in migration studies of plasticizers from plastic containers to food. It was developed and validated methods to analyze plasticizers using gas chromatography and solid phase microextraction. The study of plasticizers migration of was initially made to evaluate if the process of heating plastic containers in microwave ovens cause the migration of plasticizers for food. A new method using solid-phase microextraction with cooled fiber by liquid nitrogen (CF-SPME) with determination by gas chromatography coupled to mass spectrometry was developed and validated. To evaluate the migration of plasticizers, new plastic containers and long-term used containers were filled with ultrapure water (used as food simulant) and heated in domestic microwave at different periods of time and different power levels. The plasticizer dibutyl phthalate was found in the samples. In general, an increase in migration was observed in containers with long-term use in larger heating times. The CF-SPME was also used to evaluate the migration of plasticizers to roast chicken in plastic bags using a conventional oven. The samples of spices, which were sold together with plastic bags was also evaluated. The plasticizers diisobutylphthalae and dibutylphthalate were found in samples of spice and meat spiced chicken. The alkylphenols and plasticizers migration was also evaluated in marketed frozen vegetables. For such, a method using solid phase microextraction and comprehensive two-dimensional gas chromatography with flame ionization detector (GC × GC-FID) was developed and validated. The compounds were analyzed on samples of carrot,

potato and corn. The compounds tert-octylphenol, dibutylphthalate and benzylbutylphthalate were found in samples of carrot. The dibutylphthalate was found in one corn sample. The evaluation of plasticizers in food showed the possible sources of human contamination by these compounds, but not their exposure. Thus, for evaluation of plasticizers exposure biological samples were analyzed. Bisphenol A and plasticizers metabolites were determined in women urine samples. It was developed and validated a method for the analysis of bisphenol A and plasticizers metabolites using liquid phase microextraction and gas chromatography coupled to mass spectrometry. The metabolites were found at different concentrations in the urine samples. An evaluation study of the relationship between endometriosis and bisphenol A and plasticizers was also realized. The study showed that there is not a relationship between the concentration of bisphenol A and plasticizers metabolites in urine and the presence of endometriosis in women when the metabolites were compared.

Keywords: Alkylphenols, Plasticizers, Gas Chromatography, Comprehensive Two-dimensional Gas Chromatography, Cold Fiber - Solid Phase Microextraction, Liquid Phase Microextraction

LISTA DE FIGURAS

Figura 3. 1: Estrutura química dos compostos estudados.....	8
Figura 3.2: Principais metabólitos dos ftalatos formados no organismo humano (Samandar, Silva et al. 2009).....	10
Figura 3.3: Sistema SPME por imersão (a) e por headspace (b).....	15
Figura 3. 4: Representação esquemática de um modulador criogênico utilizado na técnica de GCxGC (fonte: (Pedroso, de Godoy et al. 2009)	16
Figura 3.5: Esquema da LPME (adaptado de (Zhang, Hu et al. 2013)	18
Figura 4. 1: Sistema de extração por SPME com resfriamento da fibra (fonte: (Menezes and Cardeal 2011))	21
Figura 4.2: Estudo eficiência de extração com e sem resfriamento da fibra de PA	26
Figura 4.3: Gráficos de Pareto obtidos no planejamento fatorial (a) DBP e (b) BBP....	27
Figura 4. 4: Curva de Calibração do DBP (a) e BBP (b) em água	28
Figura 4. 5: Cromatograma de massas dos compostos estudados por GC/MS, modo SIM	30
Figura 4. 6: Concentrações de DBP na análise do simulante nas vasilhas do Grupo I submetidos ao aquecimento em forno com radiação micro-ondas: (a) recipiente A, (b) recipiente B, (c) recipiente C, (d) recipiente D e (e) Recipiente E	31
Figura 4. 7: Concentrações de DBP na análise do simulante nas vasilhas do Grupo II submetidos ao aquecimento em forno com radiação micro-ondas: (a) recipiente F, (b) recipiente G, (c) recipiente H, (d) recipiente I e (e) Recipiente J	32
Figura 4.8: Temperaturas de simulantes nos tempos e potências estudadas nos recipientes do Grupo I (a) recipiente A, (b) recipiente B, (c) recipiente C, (d) recipiente D, (e) recipiente E	34
Figura 4.9: Temperaturas de simulantes medidas nos tempos e potências estudadas nos recipientes do Grupo II (a) recipiente F, (b) recipiente G, (c) recipiente H, (d) recipiente I, (e) recipiente J	35
Figura 5. 1: Gráficos de Pareto obtidos a partir do planejamento experimental (a) DBP, (b) DEP, (c) DiBP, (d) BBP, (e) DEHA, (f) DCHP, (g) DEHP, (h) DnOP	44
Figura 5. 2: Cromatograma de massas dos compostos estudados por GC/MS, modo SIM	46

Figura 6. 1: Diagrama de contorno obtido por GCxGC-FID de alquilfenóis e plastificantes extraídos por SPME; modulador criogênico, período de modulação foi de 5 s	55
Figura 6. 2: Diagrama de contorno obtido por GCxGC-FID em uma amostra de cenoura; modulador criogênico, período de modulação foi de 5 s.....	57
Figura 7. 1: Cromatograma de massas dos compostos estudados após derivatização por GC/qMS, modo SIM	65
Figura 7. 2: Comparação dos solventes utilizados para extração dos metabólitos de plastificantes e BPA em urina	66
Figura 7. 3: Gráficos de Pareto obtidos no planejamento fatorial	67
Figura 7. 4: Gráficos de Pareto obtidos no planejamento fatorial para otimização da derivatização.....	68
Figura 7. 5: Gráfico de efeito obtido na análise de variância dos compostos (a)MMP, (b) MIBP, (c) MBP, (d) MEHP e (e) MINP.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 3. 1: Identificação dos compostos estudados	9
Tabela 4. 1: Planejamento fatorial 2^3 para otimização da extração	22
Tabela 4. 2: Características dos recipientes plásticos usados	24
Tabela 4. 3: Áreas obtidas para os analitos nos valores de pH estudados	27
Tabela 4. 4: Parâmetros de Mérito dos compostos DBP e BBP	29
Tabela 5. 1: Íons monitorados no modo SIM na análise de plastificantes	43
Tabela 5. 2: Equações e coeficientes de determinação dos plastificantes	47
Tabela 5. 3: Precisão, limites of detecção, e limites de quantificação dos plastificantes (n =10).....	47
Tabela 5. 4: Concentrações de plastificantes determinados em amostras de carne de frango assada	48
Tabela 6. 1: Parâmetros de mérito obtidos	56
Tabela 6. 2: Concentrações de alquilfenóis e plastificantes determinadas em amostras de vegetais	58
Tabela 7. 1: Planejamento fatorial completo 2^3 para otimização da extração	62
Tabela 7. 2: Planejamento fatorial completo 2^3 para otimização da derivatização	62
Tabela 7. 3: Íons Monitorados no modo SIM na análise de metabólitos de ftalatos e BPA derivatizados	65
Tabela 7. 4: Resultados obtidos na avaliação dos parâmetros de mérito para os metabólitos de plastificantes e bisfenol A	70
Tabela 7. 5: Concentração dos metabólitos dos plastificantes e BPA em urina de mulheres do Grupo de Estudo e Grupo Controle, corrigidos pela creatinina urinário ($\mu\text{g g}^{-1}$ creatinina).....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AALLME	Microextração Líquido- líquido Assistida por Ar (<i>air-assisted liquid-liquid microextraction</i>)
ANOVA	Análise de Variância
BBP	Benzilbutilftalato
BSTFA	N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
CF-SPME	Microextração em fase sólida com fibra resfriada (<i>Cold Fiber - Solid Phase Microextraction</i>)
DBP	Dibutilftalato
DCHP	Diciclohexilftalato
DEHA	Di(etlhexil)adipato
DEHP	Di(etilhexil)ftalato
DEP	Dietilftalato
DiBP	Diisobutilftalato
DLLME	Microextração Líquido-líquido Dispersiva (<i>Dispersive Liquid-Liquid Microextraction</i>),
DMP	Dimetilftalato
DOP	Diocetilftalato
EDC	Desreguladores Endócrinos (<i>Endocrine Disrupting Chemicals</i>)
FID	Detector de Ionização em Chamas
GC	Cromatografia Gasosa
GCxGC	Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente (<i>Comprehensive Two-dimensional Gas Chromatography</i>)
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>)
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
LPME	Microextração em Fase Líquida (<i>Liquid Phase Microextraction</i>)
MBP	Monobutilftalato

MCHP	Monociclohexilftalato
MEHP	Mono(etilhexil)ftalato
MiBP	Monoisobutilftalato
MBzP	Monobenzilftalato
MiNP	Monoisononilftalato
MMP	Monometilftalato
MOP	Monooctilftalato
MS	Espectrometria de Massas
PA	Poliacrilato
SDME	Microextração por Gota Única (<i>Single Drop Microextraction</i>)
SPE	Extração em Fase Sólida (<i>Solid Phase Extraction</i>)
SPME	Microextração em Fase Sólida (<i>Solid Phase Microextraction</i>)
WHO	Organização Mundial da Saúde (<i>World Health Organization</i>)

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS.....	5
CAPÍTULO 3: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
3.1 Introdução.....	7
3.2 Sistema endócrino	7
3.3 Características dos alquilfenóis, BPA e plastificantes	8
3.4 Mecanismos de ação dos EDC	10
3.5. Alquilfenóis, plastificantes e BPA em alimentos	12
3.6. Alquilfenóis, plastificantes e BPA em amostras biológicas	17
CAPÍTULO 4: ANÁLISE DA MIGRAÇÃO DE PLASTIFICANTES PARA SIMULANTES DE ALIMENTOS EM RECIPIENTES PLÁSTICOS AQUECIDOS EM FORNOS COM RADIAÇÃO MICRO-ONDAS	20
4.1 Aspectos Gerais	20
4.2 Materiais e Métodos	20
4.2.1 Reagentes.....	20
4.2.2 Limpeza das Vidrarias.....	20
4.2.3 Otimização do Método de Extração	21
4.2.4 Extração dos Analitos.....	22
4.2.5 Extração dos Analitos.....	24
4.2.6 Sistema Cromatográfico	24
4.3 Resultados e Discussão.....	25

4.3.1	<i>Otimização da Metodologia de Extração</i>	25
4.3.2	<i>Concentração dos Ftalatos em Simulantes devido à Migração de Recipientes Plásticos Aquecidos em Forno Micro-ondas</i>	30
4.4	Conclusão	38
CAPÍTULO 5 – ANÁLISE DA MIGRAÇÃO DE PLASTIFICANTES PARA		
CARNE ASSADA EM SACOS PLÁSTICOS USANDO SPME E GC/MS.....		
40		
5.1	Aspectos Gerais	40
5.2	Materiais e Métodos	40
5.2.1	<i>Reagentes</i>	40
5.2.2	<i>Preparo da Amostra</i>	41
5.2.3	<i>Extração dos Analitos</i>	41
5.2.4	<i>Otimização das Condições de Extração e Dessorção</i>	42
5.2.5	<i>Parâmetros de Mérito</i>	42
5.2.6	<i>Sistema Cromatográfico</i>	43
5.3	Resultados e Discussão.....	43
5.3.1	<i>Otimização das Condições de Extração e Dessorção</i>	43
5.3.2	<i>Parâmetros de Mérito</i>	46
5.3.3	<i>Determinação dos plastificantes em carne de frango e tempero em contato com sacos plásticos usados no cozimento de carnes</i>	48
5.4	Conclusões.....	50
CAPÍTULO 6: ANÁLISE DE PLASTIFICANTES E ALQUILFENÓIS EM		
VEGETAIS USANDO SPME E CROMATOGRAFIA À GAS BIDIMENSIONAL		
ABRANGENTE		
52		
6.1	Aspectos Gerais	52

6.2 Materiais e Métodos	52
6.2.1 Reagentes.....	52
6.2.2 Amostras	53
6.2.3 Preparo da amostra.....	53
6.2.4 Extração dos Analitos.....	53
6.2.5 Sistema Cromatográfico	53
6.2.6 Parâmetros de Mérito.....	54
6.3 Resultados e Discussões	54
6.3.1 Parâmetros de Mérito.....	54
6.3.2 Análise de Vegetais por GCxGC-FID	56
6.4 Conclusão	59
CAPÍTULO 7: DETERMINAÇÃO DE METABÓLITOS DE PLASTIFICANTES E BISFENOL A EM MULHERES COM ENDOMETRIOSE	60
7.1 Aspectos Gerais	60
7.2 Materiais e Métodos	60
7.2.1 Reagentes.....	60
7.2.2 Otimização da Metodologia	61
7.2.3 Amostras	62
7.2.4 Extração dos Analitos.....	63
7.2.5 Parâmetros de Mérito.....	63
7.2.6 Sistema Cromatográfico	64
7.3 Resultados e Discussões	65
7.3.1 Otimização da Metodologia	66

7.3.2 Parâmetros de Mérito.....	70
7.3.3 Determinação da concentração dos metabólitos de plastificantes e bisfenol A em urina de mulheres	71
7.4 Conclusões.....	74
CAPÍTULO 8 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
REFERÊNCIAS	77
ANEXOS.....	87

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

O desenvolvimento tecnológico para preservação dos alimentos fez surgir nos últimos anos diversos tipos de embalagens. Elas, contêm compostos orgânicos capazes de acrescentar características específicas desejáveis à preservação e preparo do alimento e ao mesmo tempo, estar associados a fatores de risco à saúde de populações que consomem esses alimentos. Embalagens e utensílios que suportam temperaturas elevadas e outras condições extremas de uso surgem como alternativa às embalagens tradicionais. Contudo, estas condições extremas podem tornar estes produtos mais susceptíveis à liberação de compostos orgânicos, presentes em sua composição, para o alimento. Alguns compostos orgânicos presentes em embalagens plásticas e utensílios domésticos são suspeitos de causarem danos à saúde de homens e animais. Os alquilfenóis, o bisfenol A e os plastificantes são suspeitos de serem *endocrine disrupting chemicals* - EDC. Neste estudo o termo desreguladores endócrinos foi adotado como sinônimo de EDC. Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO – *World Health Organization*) “um desregulador endócrino é uma substância ou mistura exógena que altera uma ou mais funções do sistema endócrino e conseqüentemente causa efeitos adversos à saúde no organismo intacto, ou sua descendência, ou sub-populações” (IPCS/WHO 2002). Compostos classificados como EDC estão presentes em cosméticos, praguicidas, surfactantes, plásticos em geral e outros produtos utilizados pelo homem. Em 2000, a União Européia estabeleceu uma lista de 562 compostos suspeitos de causarem disfunção no sistema endócrino. Estes compostos podem ser divididos em diferentes classes tais como, ftalatos, alquilfenóis, retardantes de chamas, agrotóxicos, dentre outros. Os compostos abordados no presente trabalho são suspeitos de serem EDC e são amplamente estudados devido às concentrações em que são encontrados em alimentos, amostras biológicas e ambientais.

O bisfenol A (BPA) é um monômero utilizado principalmente na produção de policarbonatos e resinas epóxicas. Estes policarbonatos são comumente empregados em embalagens de alimentos e bebidas, brinquedos, e outros produtos (USEPA 2001). Outras aplicações incluem seu uso na produção de resinas de poliéster, poliacrilatos, polieteramida e resinas polisulfonas (Lintelmann, Katayama et al. 2003; Erickson 2008). BPA também pode ser utilizado como antioxidante na produção de policloreto de vinila (USEPA 2001). A ampla utilização de polímeros que possuem BPA como monômero na produção de

embalagens de alimentos e outros utensílios tem levado à contaminação ambiental por distintas fontes de exposição. O BPA pode migrar para os alimentos devido a presença de resíduos de monômeros nas embalagens ou por meio da hidrólise dos polímeros que utilizam este composto como monômero (Ballesteros-Gómez, Rubio et al. 2009).

Alguns ftalatos, como benzilbutilftalato (BBP) e di(etilhexil)ftalato (DEHP), dentre outros, também são citados como possíveis causadores de distúrbios no sistema endócrino (UE 2000). Os ftalatos possuem várias aplicações, sendo utilizados na indústria principalmente como plastificantes para aumentar a flexibilidade de plásticos utilizados na manufatura de brinquedos, utensílios, embalagens, dentre outros. Outras aplicações incluem o uso de alguns ftalatos, como dietilftalato (DEP), em cosméticos e agrotóxicos (USEPA 2001). Os ftalatos não são quimicamente ligados à matriz polimérica e por isso a migração para o alimento pode ocorrer facilmente (Fromme, Kuchler et al. 2002), conseqüentemente, são encontrados como contaminantes em muitos alimentos.

O 4-nonilfenol (4-NP) e o 4-octilfenol (4-OP) são subprodutos da degradação dos alquilfenóis etoxilados utilizados como surfactantes não iônicos em aplicações domésticas e industriais (Schroder 2001). Nonilfenol etoxilado está presente na formulação de vários agrotóxicos e seus principais metabólitos, os nonilfenóis, são considerados de baixa degradabilidade (Brix, Hvidt et al. 2001; IPCS/WHO 2002). Alquilfenóis como 4-tert-butilfenol (4-t-BP), 4-OP e 4-NP também são utilizados como monômeros na fabricação de resinas fenólicas (Ozaki and Baba 2003).

Os alquilfenóis e plastificantes tem sido reportados em amostras de alimentos em diversos estudos. Um estudo feito por Wu et. al mostrou que as concentrações de ftalatos em bebidas não alcoólicas variaram de 0,015 até 0,159 mg L⁻¹ (Wu, Pan et al. 2014). Ostrovsky et al. observaram concentrações de ftalatos de 1,5 até 12,5 µg g⁻¹ em alimentos gordurosos (Ostrovsky, Cabala et al. 2011). Os alquilfenóis e plastificantes também são encontrados em outras matrizes. Nonilfenol foi determinado em concentrações que variaram de 0,3 a 72,9 ng L⁻¹ em águas superficiais (Klosterhaus, Grace et al. 2013). Em cosméticos, ftalatos foram determinados em concentrações que variaram de 0,41 a 38,34 µg mL⁻¹ (Feng and Jiang 2012). Esta constante presença descrita em matrizes ambientais e de alimentos mostra que o homem tem ingerido estes compostos que podem ser tóxicos mesmo em baixas concentrações.

Os estudos em alimentos ajudam a elucidar as fontes de exposição do homem aos plastificantes e alquilfenóis e a relevância de cada fonte de exposição, contudo, um estudo mais amplo da exposição real pode ser feito por meio da análise de biomarcadores. Os biomarcadores são substâncias químicas ou seus metabólitos, ou ainda uma alteração biológica decorrente da interação entre o agente químico e o organismo, no qual uma correlação com a intensidade da exposição e/ou efeito biológico desta substância é estabelecida. Os biomarcadores são medidos em fluídos biológicos como sangue, urina, ar exalado entre outros. Os biomarcadores podem ser utilizados para confirmar e avaliar a exposição de indivíduos ou populações a uma determinada substância, fornecendo uma ligação entre a exposição externa e a dose interna. Para que uma substância química ou seu produto de biotransformação em fluidos biológicos sejam determinados como biomarcadores, os processos de absorção, distribuição, biotransformação e excreção devem ser bem conhecidos (IPCS 1993; Amorim 2003).

Compostos como o BPA e os ftalatos são rapidamente absorvidos e distribuídos pelo organismo através da corrente sanguínea e preferencialmente excretados pela urina (Vokel, Colnot et al. 2002). Estudos realizados em indivíduos expostos a estes compostos mostraram níveis médios de $0,18 \mu\text{g L}^{-1}$ para o bisfenol A em sangue e $0,87 \mu\text{g L}^{-1}$ em urina (He, Miao et al. 2009). O processo de biotransformação desses compostos ocorre inicialmente por reações de oxidação pelo citocromo P450 presente na fração microsômica do fígado e posteriormente por conjugação com substratos endógenos como glutatona, sulfatos e ácido glicurônico (Quesnot, Bucher et al. 2014), cujos metabólitos já foram identificados em diferentes estudos (Moffat, Burns et al. 2001; Vokel, Colnot et al. 2002; Aylward, Hays et al. 2009). Um estudo realizado por Kim et al. mostrou que o metabólito bisfenol A- glucuronida foi encontrado em amostras de urina na concentração média de $2,34 \mu\text{g L}^{-1}$ (Kim, Kim et al. 2003).

A análise dos biomarcadores de ftalatos pode ser realizada para avaliar a relação entre a presença destes compostos ou metabólitos no organismo e o surgimento de determinadas doenças buscando estabelecer umnexo-causal para as mesmas. Um estudo feito por Kim avaliou a relação entre ftalatos e a endometriose, uma doença caracterizada pela presença de tecido endometrial em locais fora da cavidade uterina, principalmente no peritoneu pélvico e ovários (Giudice and Kao 2004; Kim, Chun et al. 2011). No estudo realizado por Kim et al., foi observado que as mulheres que apresentavam um quadro

clínico de endometriose em estágio avançado apresentavam concentrações maiores de ftalatos e seus metabólitos no plasma, quando comparado a um grupo controle.

Do exposto acima, percebe-se a necessidade de pesquisas voltadas ao desenvolvimento de metodologias de análise que permitam o monitoramento de plastificantes, bisfenol A e alquilfenóis em alimentos como fonte de contaminação e seus biomarcadores em populações expostas ambientalmente, particularmente no Brasil, onde poucos estudos sobre os níveis de contaminação em alimentos e estudos em amostras biológicas são relatados.

CAPÍTULO 2: OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo principal deste estudo foi o desenvolvimento de métodos para a determinação de bisfenol A, alquilfenóis e plastificantes em amostras de alimentos e de seus metabólitos em amostras de urina. Para tal, foi utilizado como método de extração a microextração em fase sólida com fibra resfriada (CF-SPME), microextração em fase sólida convencional e microextração em fase líquida (LPME) utilizando a cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas e cromatografia à gás bidimensional abrangente com detector por ionização em chamas para análise dos compostos.

Os objetivos específicos foram:

- Propor um novo método de extração para plastificantes e alquilfenóis utilizando a técnica de CF-SPME.
- Otimizar as condições de extração dos analitos em matrizes aquosas.
- Desenvolver e validar um método para análise de plastificantes, BPA e alquilfenóis utilizando cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas.
- Analisar a migração de ftalatos para simulantes de alimentos em recipientes plásticos de polipropileno aquecidos em forno com radiação micro-ondas.
- Desenvolver e validar um método para análise de alquilfenóis e plastificantes em vegetais utilizando SPME e cromatografia à gás bidimensional abrangente acoplada a um detector por ionização em chamas (FID).
- Desenvolver e validar um método para análise de plastificantes em carne de frango assada utilizando cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas.
- Avaliar a migração de plastificantes presentes em embalagens para carne de frango quando estes são assados em forno elétrico em sacos plásticos próprios para este fim.
- Desenvolver um método para análise de metabólitos de plastificantes e BPA em amostras de urina utilizando LPME e cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas.

- Avaliar a presença de metabólitos de plastificantes e BPA em amostras de urina de mulheres com endometriose.

CAPÍTULO 3: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Introdução

Os efeitos tóxicos de alguns compostos orgânicos passaram a ser mais estudados nas últimas décadas, contudo o indício de que certas substâncias químicas poderiam causar disfunção no sistema endócrino de homens e animais surgiu no começo do século XX. Nos últimos anos, a WHO tem alertado para o risco saúde em relação à presença destes compostos no ambiente, através dos documentos oficiais elaborados em 2002 e 2012, além do alerta dado pela Comissão da Comunidade Europeia (CCE) e Environmental Protect Agency (EPA/US) desde 1999 (WHO 2002; Nogueira 2003; Maia Bila and Dezotti 2007; WHO/UNEP 2012).

Atualmente diversas substâncias, consideradas EDC, são listadas como proibidas ou tem o seu uso restringido na indústria. Um exemplo clássico é o BPA que teve seu uso proibido na fabricação de mamadeiras e utensílios infantis em diversos países como Brasil e países da União Europeia (ANVISA 2011; UE 2011).

3.2 Sistema endócrino

O sistema endócrino é constituído por uma série de glândulas que segregam hormônios diretamente na corrente sanguínea. Estes hormônios regulam várias funções do corpo. O hormônio é uma molécula produzida por uma glândula endócrina que viaja através da corrente sanguínea para produzir efeitos em células e tecidos. São exemplos de glândulas a pituitária, situada na base do cérebro, a tireóide situada no pescoço e as supra-renais situadas no abdômen. Além destas glândulas endócrinas especializadas, muitos outros órgãos que são parte de outros sistemas do corpo, tais como o coração, gordura corporal, músculo, fígado, intestinos e rins possuem funções endócrinas secundárias e também secretam hormônios. Os efeitos dos hormônios são mediados por proteínas específicas chamadas de receptores. Sem os receptores, os hormônios não podem exercer seus efeitos (WHO/UNEP 2012).

3.3 Características dos alquilfenóis, BPA e plastificantes

Os compostos suspeitos de serem EDC abrangem uma ampla classe substâncias, com diferentes polaridades e funções orgânicas. A maioria destes compostos são pouco solúveis em água. A estrutura química dos plastificantes, BPA e alquilfenóis abordados neste estudo e algumas de suas características são apresentadas na Figura 3.1 e na Tabela 3.1, respectivamente.

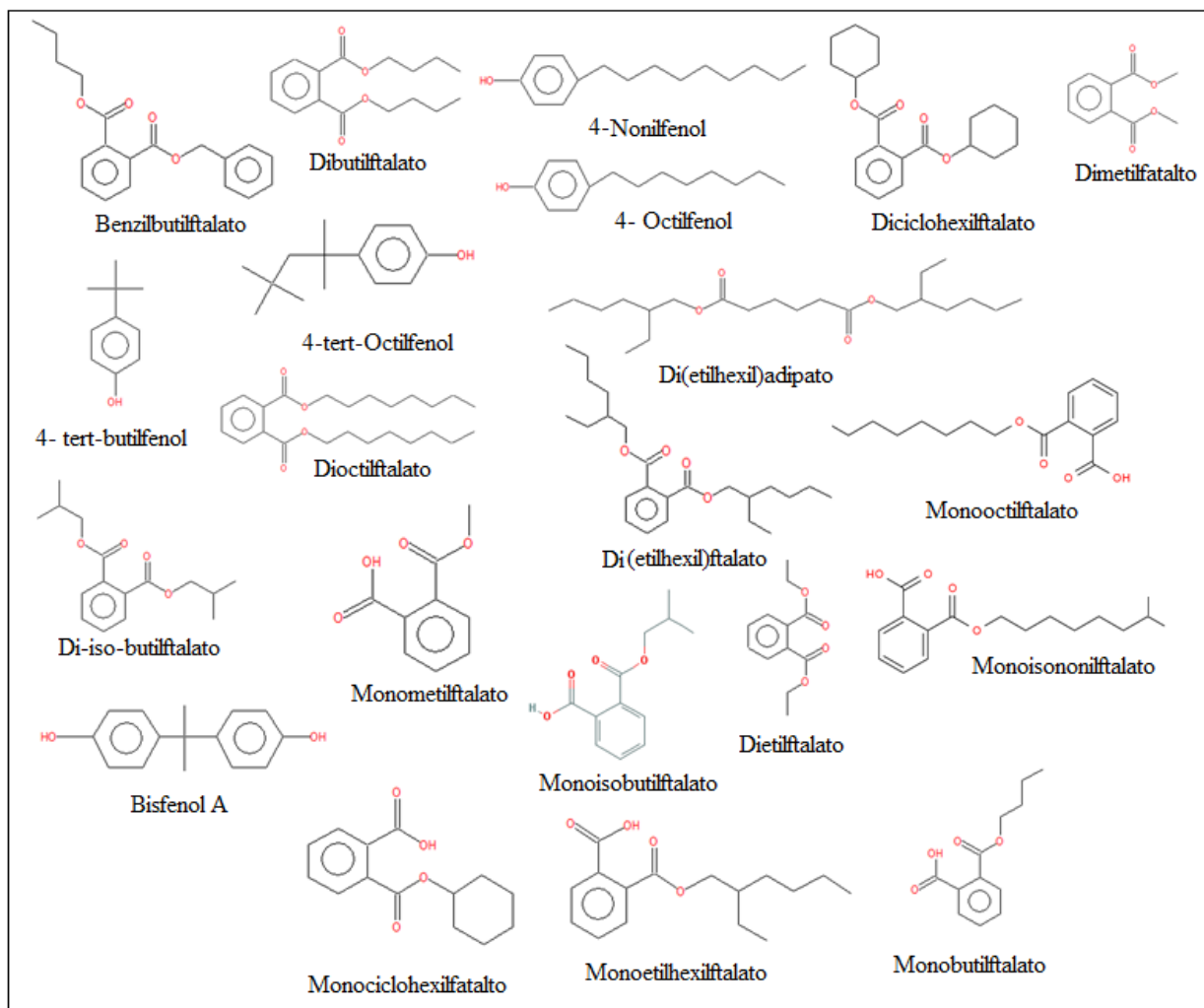


Figura 3. 1: Estrutura química dos compostos estudados

Tabela 3. 1: Identificação dos compostos estudados

Composto	Abreviação	Fórmula	CAS	Log Kow	Massa molar g mol ⁻¹
4-tert-butilfenol	4-tBP	C ₁₀ H ₁₄ O	98-54-4	3,29	150
Bisfenol A	BPA	C ₁₅ H ₁₆ O ₂	80-05-7	3,49	228
4-octilfenol	4-OP	C ₁₀ H ₂₂ O	1806-26-4	5,5	206
4- tert-octilfenol	4-tOP	C ₁₄ H ₂₂ O	140-66-9	4,12	206
4-nonilfenol	4-NP	C ₁₅ H ₂₄ O	104-40-5	5,76	220
Dibutilftalato	DBP	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	84-74-2	4,57	278
Diisobutilftalato	DiBP	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	84-69-5	4,11	278
Dimetilftalato	DMP	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	131-11-3	1,60	194
Dietilftalato	DEP	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	84-66-2	2,42	222
Di(etilhexil)adipato	DEHA	C ₂₂ H ₄₂ O ₄	103-23-1	8,12	370
Diciclohexilftalato	DCHP	C ₂₀ H ₂₆ O ₄	84-61-7	6,20	330
Diocetilftalato	DOP	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	117-84-0	8,10	390
Di(etilhexil)ftalato	DEHP	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	117-81-7	7,6	390
Benzilbutilftalato	BBP	C ₁₉ H ₂₀ O ₄	85-68-7	4,84	312
Monometilftalato	MMP	C ₉ H ₈ O ₄	4376-18-5	-	180
Monoisobutilftalato	MiBP	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	30833-53-5	-	222
Monobutilftalato	MBP	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	131-70-4	-	222
Monociclohexilftalato	MCHP	C ₁₄ H ₁₆ O ₄	7517-36-4	-	248
Mono(etilhexil)ftalato	MEHP	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	4376-20-9	-	278
Monooctilftalato	MOP	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	5393-19-1	-	278
Monoisonilftalato	MiNP	C ₁₇ H ₂₄ O ₄	-	-	292

CAS: *Chemical Abstracts Service*

Os ftalatos e BPA, são rapidamente metabolizados e excretados pela urina como conjugados, principalmente, na forma glucoronidada (Wittassek, Koch et al. 2011), (Silva, Barr et al. 2003) (Vokel, Colnot et al. 2002).

A Figura 3.2 mostra os principais metabólitos dos ftalatos. O estudo feito por Anderson et. al, para avaliar o metabolismo de DBP e BBP, mostrou que 73 % do monoéster do BBP e 69 % do monoéster do DBP são eliminados na urina nas primeiras 24

horas após a ingestão, os quais podem ser utilizados como biomarcadores de exposição (Anderson, Castle et al. 2001)

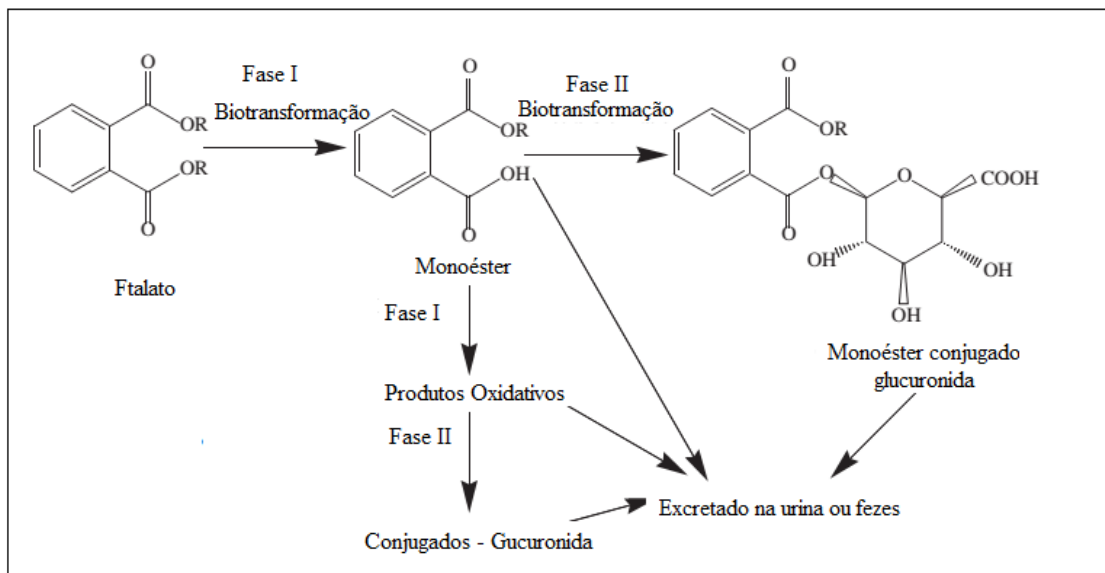


Figura 3.2: Principais metabólitos dos ftalatos formados no organismo humano (Samandar, Silva et al. 2009)

3.4 Mecanismos de ação dos EDC

Os EDC podem afetar o sistema endócrino mesmo quando estão presentes em baixas concentrações como contaminantes ambientais. Concentrações na ordem de parte por bilhão (ppb) ou até mesmo parte por trilhão (ppt) foram capazes de provocar alterações no sistema endócrino quando avaliada a exposição crônica a estes compostos (CLS 1999; Lintelmann, Katayama et al. 2003). Os EDC são suspeitos de interferirem no sistema endócrino por três possíveis mecanismos (COM 1999):

i – imitando a ação de um hormônio produzido naturalmente, como o estrogênio ou testosterona, desencadeando deste modo reações químicas semelhantes no organismo;

ii – bloqueando os receptores presentes nas células que recebem os hormônios (receptores hormonais) impedindo assim a ação dos hormônios normais;

iii – afetando a síntese, transporte, metabolismo e excreção dos hormônios, alterando assim as concentrações dos hormônios naturais.

3.5 Efeitos tóxicos dos alquilfenóis, plastificantes e BPA

Diversos estudos desenvolvidos em animais foram realizados com intuito de comprovar a interferência de determinados compostos orgânicos nos sistemas biológicos (humano e animal). A maior preocupação referente à ação de alguns compostos suspeitos de causarem disfunção no sistema endócrino está relacionada à exposição crônica. Estudos em animais mostram que ftalatos podem causar alterações nos rins, fígado e má formação fetal (Xia, Chi et al. 2011). Estudos realizados por Nagel e Vom Saal mostraram que BPA causou alterações no sistema reprodutor e redução na quantidade de espermatozoides de camundongos machos quando estes foram expostos a concentrações diárias de 2 a 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Nagel, vomSaal et al. 1997; Vom Saal, Cooke et al. 1998). Estudos mostraram ainda que altas concentrações BPA pode causar câncer em ratos (Jenkins, Raghuraman et al. 2009).

Em humanos, a primeira evidência de alterações do sistema endócrino causada por compostos químicos surgiu em 1971, quando estudos mostraram que o fármaco dietilbestrol (DES) utilizado como hormônio sintético estava relacionado à infertilidade de mulheres cujas mães haviam feito a utilização deste medicamento. Nestes estudos o uso de DES também foi relacionado com um tipo raro de câncer (Herbst, Ulfelder et al. 1999). Posteriormente outros estudos mostraram que algumas substâncias químicas poderiam possuir efeitos tóxicos para o homem. Em indivíduos do sexo masculino expostos à ftalatos, como DEHP e dibutilftalato (DBP), foi apresentada alteração na motilidade de esperma (Fredricsson, Moller et al. 1993). Outros estudos mostram que BPA pode causar alteração da secreção da prolactina em células da hipófise (Wozniak, Bulayeva et al. 2005).

Os efeitos tóxicos destes compostos também podem ser avaliados por associação da análise de seus metabólitos em fluidos biológicos e a exposição. Um estudo feito por Hauser et al. mostrou uma relação entre a concentração de metabólitos de DEHP em amostras de sêmen e danos no DNA do esperma (Hauser, Meeker et al. 2007). Um estudo feito por Meeker e Ferguson determinaram uma relação positiva entre a concentração de

ftalatos e BPA em urina e alterações nos hormônios da tireóide (Meeker and Ferguson 2011).

Apesar de estudos mostrarem um efeito tóxico causado por ftalatos, BPA e alquilfenóis mais testes em laboratório devem ser realizados para avaliação e confirmação dos danos causados por estes compostos. Alguns efeitos tóxicos atribuídos a estes compostos ainda possuem resultados contraditórios em diferentes estudos. Em um estudo realizado por Chevrier et al., no qual a exposição pré-natal a ftalatos foi avaliada, nenhuma evidência no aumento do risco de anomalias genitais nas crianças que participaram do estudo foi observada (Chevrier, Petit et al. 2012). Em outro estudo realizado por Lomenick et al., no qual a associação entre a presença de ftalatos e puberdade precoce foi avaliada, não foi observada uma relação positiva entre a exposição a ftalatos e o surgimento de puberdade precoce em crianças do sexo feminino (Lomenick, Calafat et al. 2010).

3.5. Alquilfenóis, plastificantes e BPA em alimentos

Diversas são as fontes de exposição humana aos alquilfenóis, plastificantes e BPA. O contato pode ocorrer por meio do ar, poeira, água, solo e alimento. A exposição pode ocorrer por inalação, ingestão ou contato dérmico (WHO/UNEP 2012). Estudos reportam a identificação destes compostos em amostras de ar, água potável, águas de rios e cosméticos, contudo, uma das maiores fontes de exposição são os alimentos (Huang, Lee et al. ; Romero-Franco, Hernandez-Ramirez et al. ; Moreira, Aquino et al. 2009). A contaminação dos alimentos ocorre principalmente no contato destes compostos com a embalagem ou no processo de fabricação dos mesmos.

A concentração de alquilfenóis, plastificantes e BPA no alimento depende do tempo e da temperatura de exposição. Um estudo realizado por Wildbrett em amostras de leite em contato com tubos de PVC (presentes no processo de industrialização do leite) mostrou que há um aumento da migração de ftalatos para o leite em função do aumento da temperatura nos tubos (Wildbrett 1973).

Estudos relacionados à utilização de filmes plásticos e embalagens plásticas em contato com alimentos mostram que estas embalagens também podem ser possíveis fontes de contaminação dos alimentos. Um estudo feito por Cirillo et al. em 2011 determinou

níveis de concentração de 22,8 a 270,3 ng g⁻¹ e 10,2 a 142,8 ng g⁻¹ para DEHP e DBP, respectivamente, em cereais, legumes e vegetais armazenados em embalagens plásticas (Cirillo, Fasano et al. 2011). A quantidade de alquilfenóis, plastificantes e BPA encontrados está relacionada com as características dos alimentos e dos compostos a que estes alimentos estão em contato. Compostos como DEHP, Dioctilftalato (DOP) e Disononilftalato (DiNP) possuem elevada Kow, uma medida da lipofilicidade do composto, e por isso possuem afinidade por alimentos gordurosos, como óleos e maionese (Nanni, Fiselier et al. 2011; Ostrovsky, Cabala et al. 2011). A *European Food Safety Authority* (EFSA), baseada em estudos toxicológicos, estabelece uma ingestão diária tolerável (tolerable daily intake – TDI) para os ftalatos de 0,01 mg kg⁻¹ de peso corporal por dia para o DBP, 0,5 mg kg⁻¹ de peso corporal por dia para o BBP e 0,05 mg kg⁻¹ de peso corporal por dia para o DEHP (EFSA 2005; EFSA 2005; EFSA 2005). Os ftalatos são encontrados em diversos alimentos, tais como azeite de oliva, leite e vinho (Feng, Zhu et al. 2005; Cavaliere, Macchione et al. 2008; Del Carlo, Pepe et al. 2008). Vários estudos têm sido realizados, buscando conhecer a magnitude da migração de ftalatos presentes nas embalagens para o alimento. Um estudo realizado por Gonzales-Castro et al. determinou concentrações de 0,023 µg L⁻¹ e 0,664 µg L⁻¹ para DBP e DOP, respectivamente, migrados de recipientes plásticos para simulante de alimentos (Gonzalez-Castro, Olea-Serrano et al. 2011). Kueseng et al. determinaram concentrações de 0,61 µg g⁻¹ de DEHP provindos de embalagens de condimentos (Caril) (Kueseng, Thavarungkul et al. 2007). A ANVISA baseada em diretivas da União Europeia e Estados Unidos (*Food and Drug Administration – FDA*) estabelece um limite de migração específica, expresso em mg/kg de simulante de alimento, de 30 mg kg⁻¹ para o BBP, 0,3 mg kg⁻¹ para o DBP e 1,5mg kg⁻¹ para o DEHP (Brasil 2008).

Outra classe de compostos químicos sintetizados pelo homem presentes em alimentos são os alquilfenóis, como os nonilfenóis e octilfenóis. Os alquilfenóis são derivados da degradação de alquilfenóis etoxilados presentes em surfactantes (Schroder 2001). Estes surfactantes são utilizados na formulação de detergentes utilizados para higienização dentro das indústrias de alimentos. A utilização destes detergentes é uma das causas de contaminação de alimentos por alquilfenóis (Cacho, Campillo et al. 2012). Outra fonte de contaminação inclui o uso de alquilfenóis na formulação de agrotóxicos (Brix, Hvidt et al. 2001; IPCS/WHO 2002). O nonilfenol é ainda utilizado sob a forma de tris(nonilfenol)fosfito, substância empregada como anti oxidante em materiais plásticos, os

quais podem ser empregados como embalagens para os alimentos (Guenther, Heinke et al. 2002). Um estudo realizado por Cacho et al. determinou octilfenol e nonilfenol em vegetais em concentrações que variaram de 0,42 a 2,3 ng g⁻¹ e 46 a 50 ng g⁻¹, respectivamente (Cacho, Campillo et al. 2012).

Os alquilfenóis, plastificantes e BPA estão presentes em alimentos em baixas concentrações e o desenvolvimento de técnicas analíticas altamente sensíveis são necessárias para sua quantificação. Para análise destes compostos em amostras de alimento é necessário um tratamento prévio da amostra para uma adequada extração e concentração dos compostos. Para tal, podem ser utilizadas técnicas de extração em fase sólida (SPE - solid phase extraction) (Ibrahim, Osman et al. 2014), microextração em fase sólida (SPME - solid phase microextraction) (Wu, Wang et al. 2012), microextração em gota única (SDME - single drop microextraction) (Batlle and Nerín 2004), microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME - Dispersive Liquid-Liquid Microextraction) (Farajzadeh and Mogaddam 2012; Yilmaz, Ertas et al. 2014), microextração líquido-líquido assistida por ar (AALLME - air-assisted liquid-liquid microextraction) (Farajzadeh and Mogaddam 2012) e microextração em fase líquida (LPME - liquid phase microextraction) (Villar-Navarro, Ramos-Payan et al. 2013). No presente estudo foi selecionada a técnica de SPME para extração de plastificantes e alquilfenóis em amostras de alimentos devido às suas características que são compatíveis, principalmente, com cromatografia à gás. A SPME consiste no uso de uma fibra revestida com um filme polimérico para extração e concentração de um analito presente em uma amostra (Figura 3.3). Vários tipos de materiais podem ser utilizados no revestimento da fibra, tais como polidimetilsiloxana, poliacrilato, divinilbenzeno, entre outros. O processo de extração consiste na adsorção/absorção do analito na fibra. A fibra pode ser exposta à amostra por imersão direta na solução (Figura 3.3 a) ou por headspace, no qual a fibra é exposta no espaço vazio do topo do frasco que contém a amostra (Figura 3.3 b). O processo de extração dos analitos de uma determinada amostra utilizando SPME é exotérmico e o resfriamento da fibra pode acelerar a transferência do analito para a fibra. O resfriamento da fibra utilizando dióxido de carbono foi inicialmente proposto por Ghiasvand et al., (Ghiasvand, Hosseinzadeh et al. 2006). Um novo sistema de resfriamento foi desenvolvido por Menezes e Cardeal, no qual nitrogênio líquido foi utilizado para resfriamento da fibra (Menezes and Cardeal 2011). A fibra é subsequentemente inserida dentro do injetor do cromatógrafo à gás para desorção do analito.

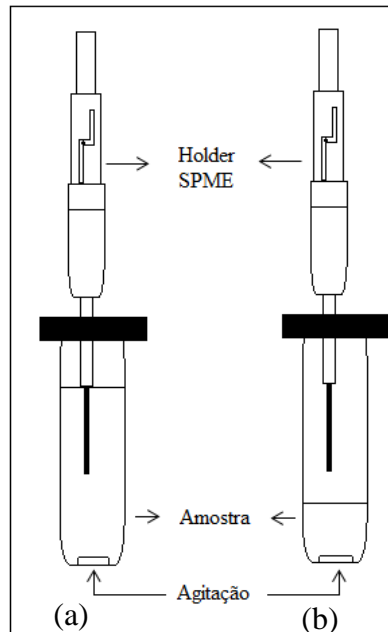


Figura 3.3: Sistema SPME por imersão (a) e por headspace (b)

A técnica de cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas tem sido muito utilizada com SPME, contudo, nos últimos anos a cromatografia à gas bidimensional abrangente (GCxGC) também tem sido aplicada para análise de desreguladores endócrinos. A cromatografia a gás bidimensional abrangente é um sistema que usa dois processos (duas colunas cromatográficas) de separação distintos para separação dos compostos. As colunas utilizadas possuem mecanismos de separação independentes. O termo abrangente é utilizado porque toda a amostra eluída da primeira coluna (1D) é introduzida na segunda coluna (2D) e toda a separação ocorrida na primeira coluna é mantida na segunda coluna (von Muhlen, Zini et al. 2007). Na 1D é utilizada uma coluna com dimensões clássicas, já na 2D uma coluna curta é utilizada para que o tempo de separação dos compostos em 2D seja suficientemente curto e a eluição se complete antes da próxima fração de eluato (Pedroso, de Godoy et al. 2009). Geralmente na 1D uma coluna capilar contendo fase estacionária de baixa polaridade é utilizada, ao passo que na 2D é empregada uma coluna de fase estacionária de média a alta polaridade. A diferença na seletividade química entre as duas colunas permite que os compostos que não são adequadamente separados na primeira dimensão sejam completamente resolvidos na segunda dimensão (Bruckner, Prazen et al. 1998). Uma interface denominada modulador é usada para separar o eluato da 1D em pequenos frações, reconcentrá-lo e subsequentemente, transferí-lo para a 2D.

(Dallüge, Beens et al. 2003; Vendeuvre, Bertoncini et al. 2004). Os moduladores podem ser do tipo criogênico, de válvulas ou térmico. No modulador de válvula, uma válvula é inserida entre as colunas para controle da transferência de frações do eluato da 1D para a 2D (Bruckner, Prazen et al. 1998; Pedroso, de Godoy et al. 2009). Este tipo de modulador possui a desvantagem de não reconcentrar as frações do eluato provenientes da primeira coluna antes de enviá-lo para a segunda coluna. Os moduladores térmicos e criogênicos fazem o controle da transferência do eluato da primeira para a segunda coluna utilizando alterações na temperatura. No modulador térmico o eluato da 1D é aprisionado em um sorvente e posteriormente, por dessorção térmica, é enviado para a 2D. Os moduladores criogênicos usam um meio criogênico para aprisionamento do eluato provindo da 1D. Com esta armadilha criogênica, o eluato é reconcentrado e enviado para a 2D (Figura 3.4) (Marriott and Shellie 2002; Pedroso, de Godoy et al. 2009). No desenvolvimento do presente estudo, o modulador criogênico foi utilizado.

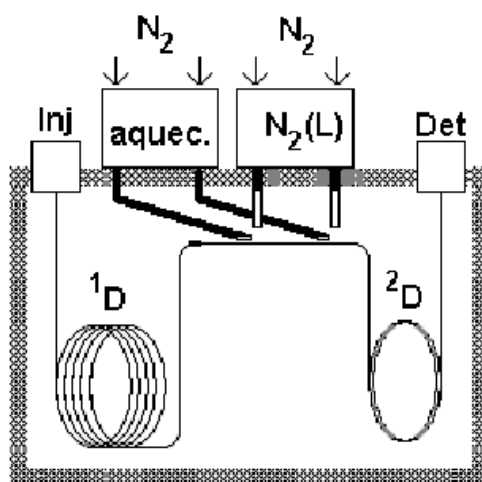


Figura 3. 4: Representação esquemática de um modulador criogênico utilizado na técnica de GCxGC (fonte: (Pedroso, de Godoy et al. 2009))

Em muitas análises, onde cromatografia a gás unidimensional é utilizada, tem-se ocorrência de interferentes que podem coeluir com os compostos de interesse prejudicando assim a análise. Na GCxGC o uso de duas colunas possibilita um aumento na separação dos compostos. Outra vantagem decorrente do uso de GCxGC é o aumento da detectabilidade. O processo de modulação comprime as bandas cromatográficas do eluato da primeira coluna, com isso cada analito elui como uma série de picos estreitos e intensos,

sendo mais facilmente detectados (Marriott and Shellie 2002). A técnica GCxGC tem sido aplicada na análise de muitos compostos orgânicos (Murray 2012). Djokic et al. mostrou que GCxGC-FID pode ser aplicada com sucesso na quantificação de compostos orgânicos do biodiesel (Djokic, Dijkmans et al. 2012). Outros estudos reportam a aplicação de GCxGC em matrizes biológicas. Amorim et al. obteve limites de detecção de 0,03 a 0,18 $\mu\text{g L}^{-1}$ na análise de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em urina (Andre Amorim, Dimandja et al. 2009). Andrews and Paterson mostraram que GCxGC/MS pode ser utilizado para quantificação de drogas ilícitas presentes em baixas concentrações em amostras de sangue (Andrews and Paterson 2012). Alguns estudos reportam o uso da GCxGC para análise qualitativa de alquilfenóis e plastificantes (Guenther, Kleist et al. 2006; Vallejo, Olivares et al. 2011), entretanto a sua aplicação para análise quantitativa destes compostos ainda tem sido pouco reportada. O uso da GCxGC possibilita uma separação mais eficiente dos compostos, o que permite que esta técnica seja utilizada com detectores universais de baixo custo, como o detector de ionização em chamas (FID), portanto é uma alternativa eficiente na quantificação de alquilfenóis e plastificantes em amostras de alimentos e biológicas

3.6. Alquilfenóis, plastificantes e BPA em amostras biológicas

A avaliação biológica da exposição por meio do uso de biomarcadores fornece uma ligação crítica entre a exposição à substância química, dose interna e prejuízo à saúde, e eles são valiosos na avaliação de risco. As informações provenientes da análise dos biomarcadores e sua associação com o risco à saúde possibilitam a implementação de medidas de prevenção e controle apropriadas, como normas regulamentadoras de exposição e definição dos níveis permissíveis, ou mesmo aponta a necessidade de não exposição.

A análise de alquilfenóis, plastificantes e BPA em amostras biológicas pode ser realizada através da determinação de seus metabólitos em sangue, urina ou saliva. (ATSDR 1995; ATSDR 2001; ATSDR 2002). A análise dos metabólitos dos ftalatos em urina exige um preparo prévio da amostra, no qual exige um processo de hidrólise do metabólito conjugado. Esta hidrólise normalmente é feita com enzimas específicas. Para desglucoronidação, as enzimas β -glucuronidase (Blount, Milgram et al. 2000) e α -glucuronidase (Egestad, Green et al. 1996) são utilizadas. A quantidade de enzima

necessária dependerá da quantidade de amostra inicial e concentração da enzima. Frederiksen et al. utilizaram 5 μL de enzima para 500 μL de amostra (Frederiksen, Jorgensen et al. 2010). Holm et al. utilizaram 250 μL de β -glucoronidase para 50 mL de amostra de urina (Holm, Solbu et al. 2004). Um período ideal de incubação também é necessário para hidrólise completa. Frederiksen et al., Blount et al. e Kato et al. utilizaram um tempo de 90 min e uma temperatura de 37 °C para completa hidrólise (Blount, Milgram et al. 2000; Kato, Silva et al. 2005; Frederiksen, Jorgensen et al. 2010). Estudos feitos por Koch et al. e Holm et al. (Koch, Gonzalez-Reche et al. 2003) mostraram que uma hidrólise eficaz também pode ser obtida com 37°C e um tempo de incubação de 60 min (Koch, Gonzalez-Reche et al. 2003; Holm, Solbu et al. 2004). O pH da hidrólise deve ser controlado no processo, pois cada enzima tem um pH ótimo de ação. Este controle é feito pelo uso de soluções tampão de acetato de amônio (Frederiksen, Jorgensen et al. 2010) ou o ajuste de pH (Holm, Solbu et al. 2004) pode ser feito. A hidrólise é cessada com a adição de ácido na amostra, por exemplo, ácido fosfórico e acético (Frederiksen, Jorgensen et al. 2010). Após a hidrólise os analitos são extraídos da amostra.

No presente estudo, os metabólitos foram analisados em amostras de urina e LPME foi utilizado como técnica de extração. A LPME consiste na utilização de uma fibra oca, porosa e hidrofóbica, que é impregnada com um solvente orgânico e o interior da fibra também é preenchido com um solvente orgânico denominado fase aceptora. A fibra é colocada no interior da amostra (fase doadora) e com a aplicação de agitação, os analitos migram da matriz para a fase aceptora (Figura 3.5).

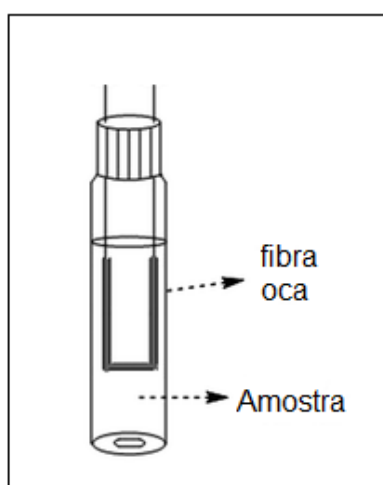


Figura 3.5: Esquema da LPME (adaptado de (Zhang, Hu et al. 2013)

Após a extração, os analitos podem ser analisados por cromatografia líquida ou gasosa. Na cromatografia líquida o analito pode ser analisado diretamente após a extração dos compostos.

Para uso de cromatografia gasosa, uma etapa de derivatização dos metabólitos é necessária para gerar derivados dos metabólitos mais voláteis. Para tal, BSTFA com 1 % de TMCS tem sido aplicado com sucesso na derivatização de BPA e monoésteres (Rastkari and Ahmadkhaniha 2013; Song, On et al. 2013; Kim, Lee et al. 2014). De acordo, com Basheer et al., BSTFA se mostrou um derivatizante rápido e eficiente na derivatização de BPA (Basheer, Parthiban et al. 2005). Após a etapa de derivatização a análise cromatográfica dos compostos é feita.

CAPÍTULO 4: ANÁLISE DA MIGRAÇÃO DE PLASTIFICANTES PARA SIMULANTES DE ALIMENTOS EM RECIPIENTES PLÁSTICOS AQUECIDOS EM FORNOS COM RADIAÇÃO MICRO-ONDAS

4.1 Aspectos Gerais

Vários estudos sobre a migração de ftalatos já foram realizados, contudo, pouco se sabe sobre a migração destes compostos para alimentos presentes em embalagens quando estas são submetidas à diferentes condições de aquecimento em forno micro-ondas doméstico. Portanto, este estudo avaliou a migração de dois ftalatos, BBP e DBP, de diferentes frascos plásticos, empregando amostras de água utilizadas como simulantes de alimentos, aquecendo-as em forno com radiação micro-ondas, em diferentes condições de tempo e potências nominais.

4.2 Materiais e Métodos

4.2.1 Reagentes

Os padrões de dibutilftalato (DBP) e benzilbutilftalato (BBP) utilizados neste estudo foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Uma solução estoque na concentração de 2000 mg L⁻¹ foi preparada em etanol grau HPLC da J.T.Baker (Xalostoc, Edo. De Mex, México). A fibra de poliacrilato 80 µm (PA), utilizada no experimento foi obtida da Supelco (Bellefonte, PA, USA). A água ultrapura utilizada foi preparada em um purificador Elga – modelo Purelab Classic UVMK2.

4.2.2 Limpeza das Vidrarias

A determinação de compostos em níveis traços em amostras requer uma limpeza adequada das vidrarias para um resultado confiável. A etapa de limpeza consistiu inicialmente na lavagem de toda a vidraria com detergente neutro (Extram) 5,0 % (v/v) com sonicação por 1 hora. Após a sonicação, as vidrarias foram enxaguadas com água deionizada e lavadas com uma solução de etanol. Em seguida foi realizado um enxágue com água ultra-pura.

4.2.3 Otimização do Método de Extração

- Resfriamento da Fibra

O processo de absorção/adsorção dos analitos na fibra é um processo exotérmico (Zhang and Pawliszyn 1995). Para avaliar a influência da temperatura da fibra na eficiência de extração dos compostos foram feitas análises utilizando um sistema de resfriamento da fibra. O resfriamento foi feito na parte externa da fibra que foi envolvida por um espiral de cobre com comprimento de 70 cm e diâmetro interno de 1,6 mm. Uma extremidade do tubo de cobre foi imersa em nitrogênio líquido armazenado em uma garrafa térmica. A outra extremidade continha o espiral que envolvia a fibra externamente. Para controle da pressão do nitrogênio foi utilizado uma válvula de cobre acoplada a uma mangueira de silicone. A Figura 4.1 apresenta a montagem utilizada. Um estudo da eficiência de extração utilizando as duas formas de extração, com resfriamento e sem resfriamento da fibra, foi feito. A análise dos compostos foi feita em triplicata na concentração de $300,0 \mu\text{g L}^{-1}$. A extração do analito foi feita por imersão direta.

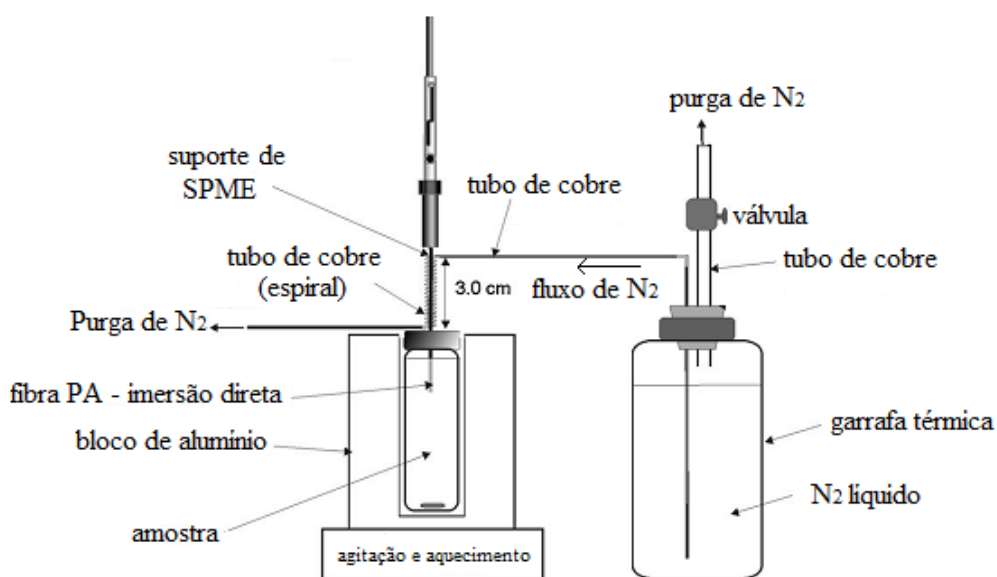


Figura 4. 1: Sistema de extração por SPME com resfriamento da fibra (fonte: (Menezes and Cardeal 2011))

- Planejamento Fatorial 2³ Completo com Ponto Central

Um planejamento fatorial 2³ completo com ponto central foi feito para avaliar a significância das variáveis, tempo de extração, temperatura de extração (medida no bloco de aquecimento) e concentração de sal (efeito *salting out*) no processo de extração. As condições utilizadas estão descritas na Tabela 4.1. A concentração final dos analitos na solução padrão aquosa foi de 100,0 µg L⁻¹.

Tabela 4. 1: Planejamento fatorial 2³ para otimização da extração

Experimento	Tempo (min)	Temperatura (°C)	% NaCl (m/v)
F1	30	65	0
F2	10	65	0
F3	30	25	0
F4	10	25	0
F5	30	65	10
F6	10	65	10
F7	30	25	10
F8	10	25	10
F9	20	45	5
F10	20	45	5
F11	20	45	5

- Avaliação do Efeito do pH

A influência do pH foi avaliada em três diferentes valores: meio ácido (pH = 3), meio neutro (pH = 7) e meio básico (pH = 10) após a determinação da melhor condição obtida no planejamento fatorial 2³. As soluções aquosas utilizadas no experimento foram preparadas a partir da solução estoque em frascos de vidro de 22,0 mL. A concentração e volume final dos ftalatos foi de 50,0 µg L⁻¹ e 20,0 mL, respectivamente. O ajuste do pH foi feito com ácido sulfúrico (50 % v/v) e hidróxido de amônio (50 % v/v).

4.2.4 Extração dos Analitos

Para avaliar a migração de ftalatos para alimentos foi utilizado água ultra-pura como simulante de acordo com a Portaria No. 26/MS/SVS do Ministério da Saúde do Brasil (ANVISA 1996), De acordo com a ANVISA, a água ultra-pura é um simulante adequado

para alimentos líquidos com pH maior que 5, apesar da legislação da União Européia considerar o etanol 10 % (v/v) como simulante de alimentos líquidos (UE 2011).

Neste estudo foram utilizados dez recipientes plásticos de polipropileno de diferentes marcas e volumes, próprios para uso em forno com radiação micro-ondas. Destes, cinco foram recipientes novos adquiridos para realização do estudo e cinco recipientes com prolongado tempo de uso (aproximadamente 1 ano). Os recipientes plásticos utilizados em forno micro-ondas sofrem pequenas deformações com o tempo de uso devido ao constante aquecimento do material, por isso os recipientes com prolongado tempo de uso continham pequenas deformações.

Os recipientes foram preenchidos com água ultrapura até 90 % do seu volume total. Posteriormente, estes foram introduzidos em um micro-ondas doméstico (potência nominal de 700 W) no qual o simulante foi aquecido variando-se a potência nominal (alta, 700 W; média, 350 W; e baixa, 210 W) e o tempo de aquecimento. Na potência alta e média os tempos de aquecimento foram de 1, 3, 5 e 7 min. Na potência baixa os tempos de aquecimentos avaliados foram de 10, 15, 20 e 30 min. As condições de potência e duração do aquecimento foram escolhidas baseadas nas condições que são utilizadas comumente no cotidiano, isto é, as potências alta (para o cozimento de alimentos) e média (para o aquecimento de alimentos) são utilizadas em tempos mais curtos, ao passo que a potência baixa (para o descongelamento de alimentos) é utilizada por maiores períodos de aquecimento. A temperatura das amostras foram medidas após o aquecimento utilizando um termômetro. Algumas amostras que apresentaram concentrações dos compostos estudados acima da faixa de concentração da curva de calibração foram diluídas em 50 % com água ultra-pura. As características de todos os recipientes usados neste estudo são descritas na Tabela 4.2.

Tabela 4. 2: Características dos recipientes plásticos usados

Recipientes Plásticos	Volume (mL)	Características
A ¹	750	incolor, tamanho: 10,5 cm (dm) × 11,0 cm
B ¹	500	vermelho translúcido, tamanho: 10,5 cm (dm) × 6,2 cm
C ¹	600	incolor, tamanho: 13,2 cm × 13,2 cm × 4,8 cm
D ¹	1200	incolor, tamanho: 12,6 cm × 12,6 cm × 11,0 cm
E ¹	480	incolor, tamanho: 12,5 cm × 9,3 cm × 5,3 cm
F ²	600	incolor, tamanho: 13,0 cm × 13,0 cm × 4,7 cm
G ²	1000	incolor, tamanho: 13,7 cm × 10,0 cm × 2,7 cm
H ²	600	incolor, tamanho: 11,2 cm (dm) × 6,6 cm
I ²	1200	incolor, tamanho: 22,0 cm × 15,0 cm × 4,6 cm
J ²	300	incolor, tamanho: 13,8 cm (dm) × 7,9 cm

Nota: ¹recipientes novos; ²recipientes que foram usados por um período prolongado de tempo; dm: diâmetro

4.2.5 Extração dos Analitos

Após o preparo da amostra uma alíquota de 20,0 mL foi colocada em um frasco de 22 mL para a extração por SPME. A amostra foi continuamente agitada com uma barra magnética colocada no interior do frasco. A extração foi feita por imersão direta da fibra de SPME utilizando o sistema de resfriamento. Uma fibra de poliacrilato de 85 µm foi utilizada no procedimento. Posteriormente, a fibra foi colocada no injetor do cromatógrafo à gás para desorção dos compostos a 250 °C por 2 min.

4.2.6 Sistema Cromatográfico

Para a determinação dos ftalatos no simulante de alimentos líquidos, foi utilizado um cromatógrafo à gas acoplado a um espectrômetro de massas com analisador do tipo *ion trap* (Finnigan Trace GC/PolarisQ – Thermo – Waltham - EUA). A análise cromatográfica foi feita com injeção no modo splitless por 2 min, utilizando uma coluna HP-5MS Agilent (Santa Clara – EUA) (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) com uma temperatura do injetor de 250 °C e fluxo de hélio de 1,2 mL min⁻¹. Foi utilizada uma rampa de temperatura com aquecimento inicial de 105 °C por 1 min, seguido de aumento para 180 °C a 3 °C min⁻¹, mantida por 4 min, e novo aumento para 290 °C a 10 °C min⁻¹, mantida por 0,5 min. O tempo total de corrida foi de 41,5 min. A análise foi realizada no modo SIM (Selected Ion Monitoring) com ionização por elétrons (EI) e energia de 70 eV. As razões massa/carga (m/z) monitoradas foram 149, 150 e 41 para o DBP e 149, 91 e 206 para o BBP.

4.2.6 Parâmetros de Mérito

A metodologia desenvolvida para determinação do DBP e BBP foi validada de acordo com as diretrizes da EURACHEM (EURACHEM 2002). Para avaliação dos parâmetros de mérito foi utilizado uma solução aquosa dos padrões. Foram determinados limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), precisão intra e inter ensaio e linearidade. A linearidade da curva foi avaliada em triplicatas independentes em um intervalo de 0,1 a 8,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de concentração para o DBP e de 0,5 a 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o BBP. Os testes de precisão foram avaliados em duas concentrações distintas da curva, 1,0 e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. A precisão intra-ensaio foi determinada através da análise de 10 replicatas de soluções aquosas dos analitos em cada concentração avaliada no mesmo dia. A precisão inter-ensaio foi feita usando o mesmo procedimento, contudo a análise foi feita em diferentes dias. O LOD foi avaliado através da análise de 10 replicatas do branco. Os resultados de área obtidos através da aplicação da equação 4.1 foram substituídos na equação da curva de calibração do analito para se obter o valor de concentração do LOD. O LOQ foi considerado como o menor ponto da curva de calibração.

$$\text{Área para cálculo do LOD} = \text{área média} + (3 \times S) \quad \text{Equação 4.1}$$

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Otimização da Metodologia de Extração

- Resfriamento da Fibra

Foram realizados testes de resfriamento com fibra de poliacrilato. Em estudo realizado por Prokupkova et al. a fibra de poliacrilato apresentou uma maior eficiência de extração quando comparada à outras fibras e por isto, esta foi escolhida para extração dos compostos (Prokupkova, Holadova et al. 2002). Os resultados obtidos são apresentados na Figura 4.2

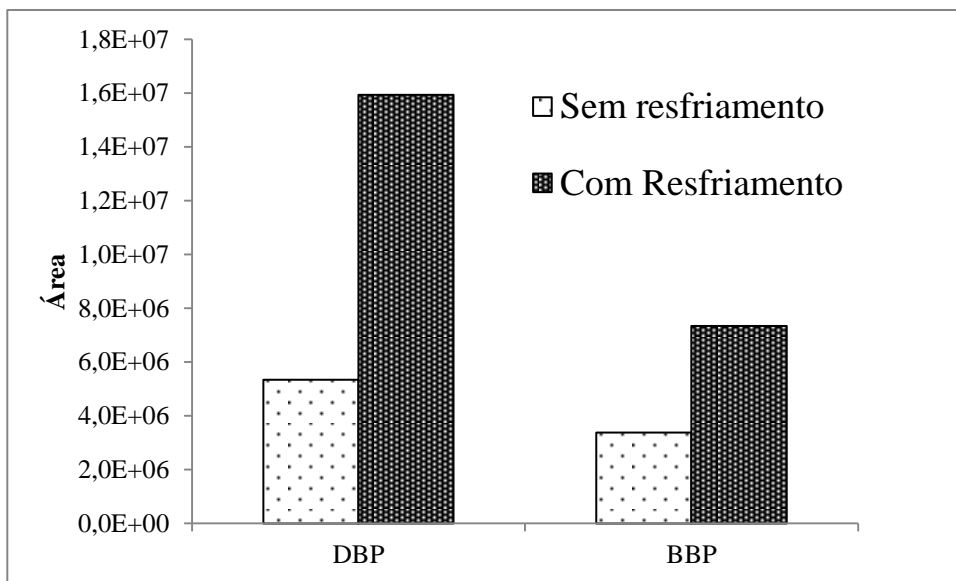


Figura 4.2: Estudo eficiência de extração com e sem resfriamento da fibra de PA

O método de extração no qual o resfriamento da fibra foi utilizado apresentou uma maior eficiência, portanto, o resfriamento da fibra foi adotado no processo de extração dos compostos estudados.

- Planejamento Fatorial 2^3 Completo com Ponto Central

As variáveis do processo de extração dos analitos foram avaliadas através de um planejamento fatorial 2^3 completo com ponto central. O planejamento fatorial foi necessário para avaliação dos parâmetros significativos no processo de extração. A otimização foi feita utilizando uma solução aquosa dos padrões de concentração igual a $100 \mu\text{g L}^{-1}$. Um elevado valor de concentração foi utilizado, assim, todas as condições testadas foram aptas para produzir picos na análise cromatográfica com uma área que permitiu a quantificação dos compostos. Neste estudo o software Statistica (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) foi utilizado para avaliação dos resultados. Os gráficos de Pareto obtidos para cada composto são apresentados na Figura 4.3.

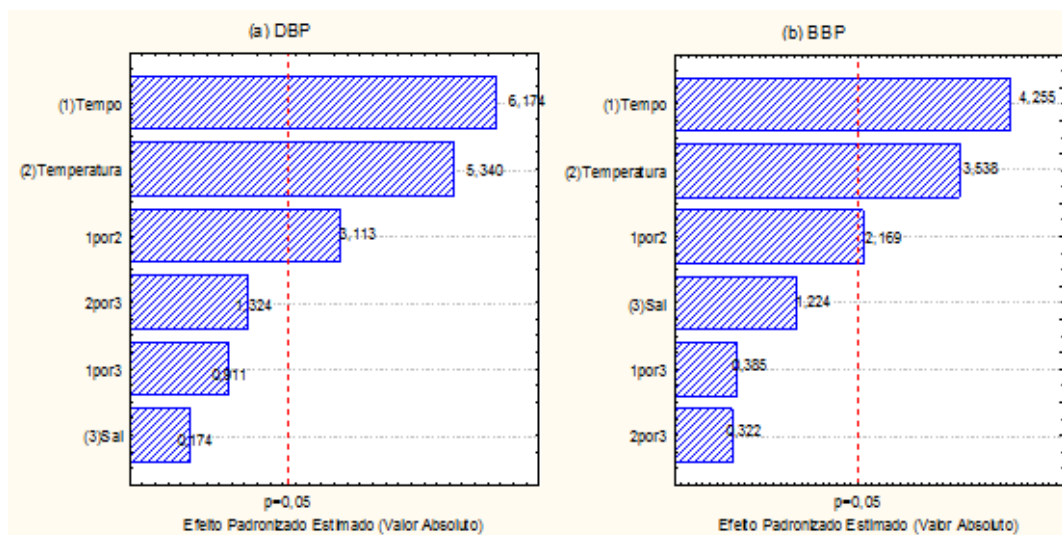


Figura 4.3: Gráficos de Pareto obtidos no planejamento fatorial (a) DBP e (b) BBP

A partir dos dados obtidos nos gráficos, foi observado que o tempo, temperatura, e a interação entre estas duas variáveis foram efeitos significativos para a extração dos ftalatos, considerando um intervalo de confiança de 95 %. Os gráficos mostraram que a variáveis tempo e temperatura seguiram a mesma tendência para os dois compostos. Portanto, os maiores valores de área foram obtidos quando o tempo de 30 min e a temperatura do bloco de aquecimento de 65 °C foram usados. Estas condições foram adotadas no procedimento analítico. Não foi feita a adição de sal, pois este parâmetro não foi significativo no domínio experimental estudado.

- Avaliação do Efeito do pH

Os resultados de área obtidos para cada analito nos diferentes valores de pH analisados são apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4. 3: Áreas obtidas para os analitos nos valores de pH estudados

Composto	pH 3		pH 7		pH 10	
	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio
DBP	10.596.962	1.294.418	13.319.716	578.289	8.740.111	1.541.277
BBP	7.050.986	717.473	8.388.603	574.680	3.986.162	945.325

Para avaliação dos resultados, os testes estatísticos ANOVA e teste de Tukey foram aplicados. O teste ANOVA mostrou que as médias de áreas obtidas para o DBP e BBP são distintas nos valores de pH avaliados. O teste de Tukey foi aplicado para avaliar quais condições de pH diferem entre si. De acordo com o resultado obtido, o meio básico apresenta resultados distintos do meio neutro para os dois analitos. O meio ácido e neutro apresentam valores de médias estatisticamente iguais. A Tabela 4.3 mostra que os valores médios de áreas obtidos para os meios neutro e ácido são maiores que os valores obtidos para o meio básico, portanto, somente para análise de amostras básicas o pH deve ser ajustado.

- Parâmetros de Mérito

A faixa onde a linearidade foi observada foi de 0,2 a 6,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para DBP e 0,5 a 6,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para BBP. As curvas de calibração obtidas são apresentadas na Figura 4.4.

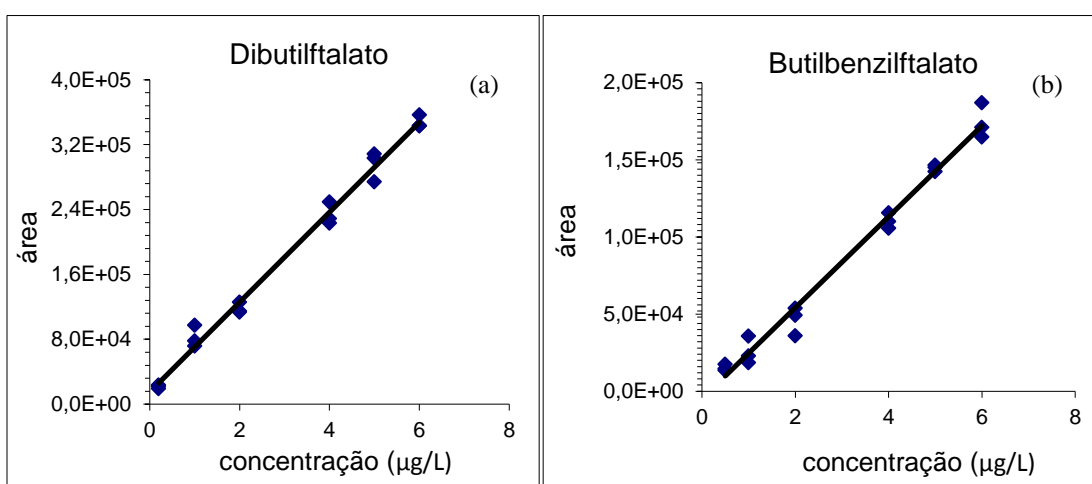


Figura 4. 4: Curva de Calibração do DBP (a) e BBP (b) em água

Para avaliar a linearidade das curvas obtidas foram aplicados os testes estatísticos de normalidade dos resíduos (Teste de Ryan-Joiner), independência dos resíduos (Teste de Durbin-Watson), homocedasticidade dos resíduos (Teste de Brown-Forsythe), significância da regressão e desvio da linearidade (ANOVA) (de Souza and Junqueira 2005). Os testes aplicados mostraram que os resíduos seguem uma distribuição normal, são independentes e homocedásticos. O teste estatístico ANOVA mostrou que a regressão é

significativa e não há desvio da linearidade, portanto a regressão linear pode ser utilizada para quantificação dos ftalatos. As equações das retas, os coeficientes de determinação, bem como os parâmetros de precisão, LOD e LOQ, obtidos na avaliação dos parâmetros de mérito são mostrados na Tabela 4.4.

Tabela 4. 4: Parâmetros de Mérito dos compostos DBP e BBP

Composto	Equação de regressão linear	R ²	LOD µg Kg ⁻¹	LOQ µg Kg ⁻¹	Precisão - CV (%)			
					1.0 µg L ⁻¹		5.0 µg L ⁻¹	
					Intra	Inter	Intra	Inter
DBP	$y = 5,5 \times 10^4 x + 14941$	0,9905	0,08	0,20	11,7	11,9	7,6	8,2
BBP	$y = 2,9 \times 10^4 x - 4883$	0,9854	0,31	0,50	16,2	22,3	11,0	13,9

CV: coeficiente de variação

Os resultados dos parâmetros de mérito estudados foram satisfatórios. Os valores de LOD e LOQ obtidos para o DBP foram menores que os limites obtidos para o BBP. Quando comparados à outros estudos de simulantes em alimentos os valores de LODs encontrados mostraram-se menores. Batlle e Nerín, usando SDME e GC-FID, obtiveram LOD para o DBP de 0,03 µg L⁻¹ quando água destilada foi utilizada como simulante e 0,16 µg L⁻¹ quando uma solução de ácido acético (3 % m/v) em água destilada foi utilizada como simulante de alimento (Batlle and Nerín 2004). Jen e Liu, usando um sistema de microdiálise com fibra oca e HPLC/UV, obtiveram LOD de 0,4 µg L⁻¹ em solução aquosa para o DBP, na avaliação da migração de ftalatos de recipientes sob condições de aquecimento (Jen and Liu 2006). Os LODs observados neste trabalho também mostraram-se superiores quando comparados à métodos cuja extração e análise foram realizadas por SPME e GC/MS. Em um estudo de análise de ftalatos em leite de vaca, os LODs observados para o DBP e BBP foram de 0,02 e 0,23 µg kg⁻¹ (Feng, Zhu et al. 2005).

Os coeficientes de variação observados neste estudo foram relativamente maiores quando comparados a desvios reportados na literatura, contudo, a precisão depende da faixa de concentração estudada. Em um estudo realizado por Cavaliere e colaboradores foram reportados desvios de 9,5 % e 3,0 % para DBP e BBP em amostras de azeite de oliva na concentração de 0,5 mg kg⁻¹ (Cavaliere, Macchione et al. 2008).

Uma amostra de branco analítico foi preparada e analisada periodicamente para determinar a contaminação por ftalatos. Uma baixa concentração de DBP foi detectada na

amostra do branco. A concentração determinada foi menor que o LOQ, porém, esta foi considerada na determinação deste composto nas amostras e durante o processo de validação. O cromatograma obtido no modo SIM para um padrão de concentração igual a $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ é mostrado na Figura 4.5.

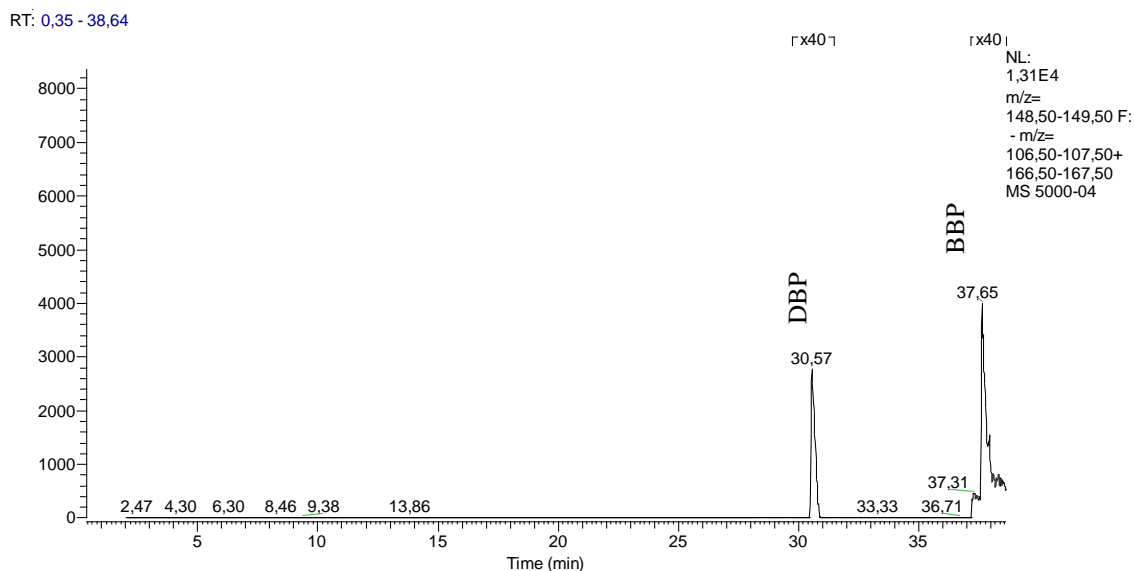


Figura 4. 5: Cromatograma de massas dos compostos estudados por GC/MS, modo SIM

4.3.2 Concentração dos Ftalatos em Simulantes devido à Migração de Recipientes Plásticos Aquecidos em Forno Micro-ondas

Os recipientes plásticos utilizados para análise da migração foram divididos em dois grupos: cinco recipientes novos (Grupo I) e cinco recipientes com prolongado tempo de uso (Grupo II). A presença de BBP não foi observada em nenhuma das amostras avaliadas. Os resultados obtidos para o DBP são apresentados na Figura 4.6 e 4.7.

GRUPO I: Recipientes plásticos novos

As concentrações de DBP provenientes da migração deste composto para o simulante de alimento quando os recipientes plásticos do Grupo I foram aquecidos no forno micro-ondas em diferentes condições são apresentadas na Figura 4.6 a-e

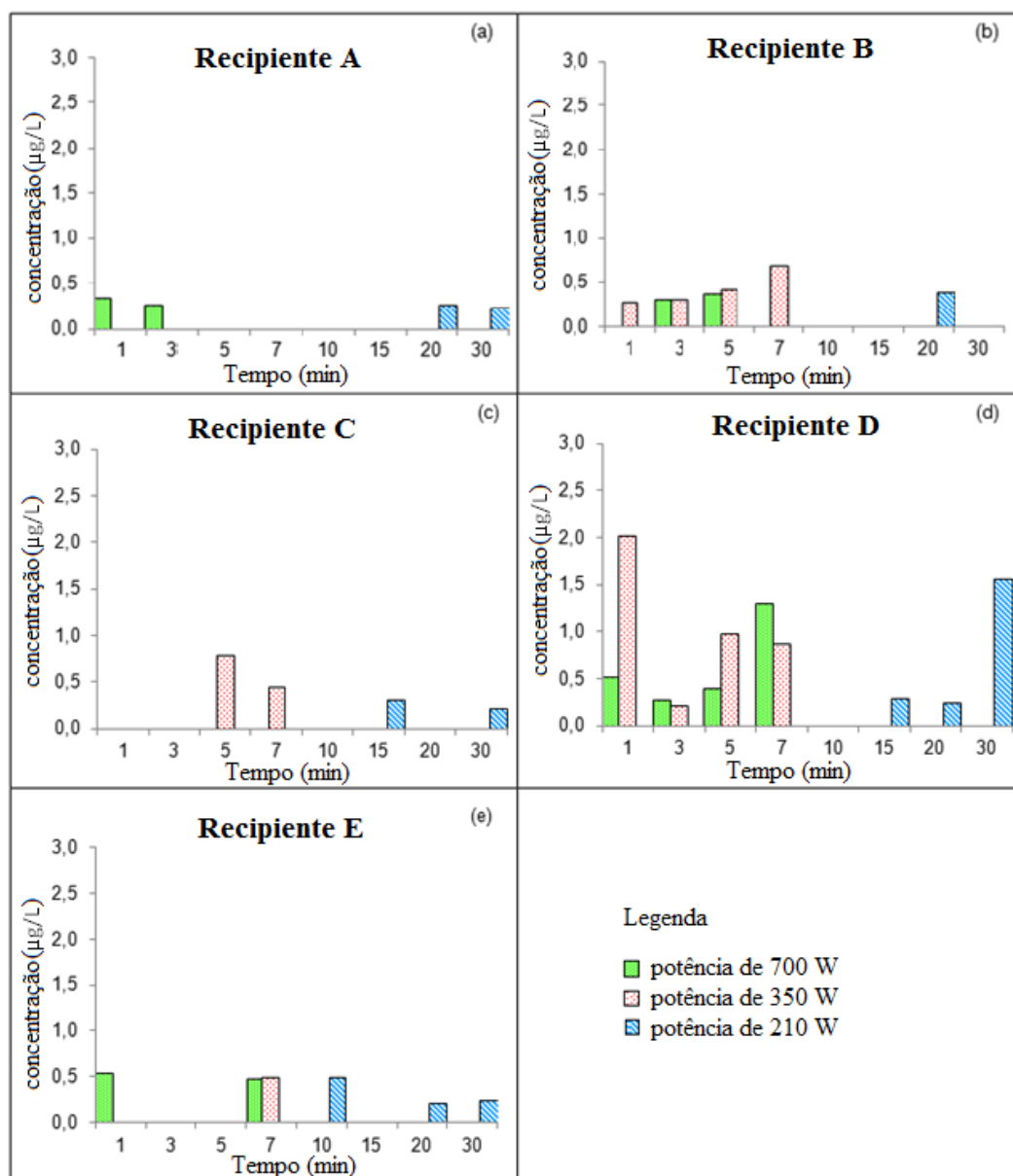


Figura 4. 6: Concentrações de DBP na análise do simulante nas vasilhas do Grupo I submetidos ao aquecimento em forno com radiação micro-ondas: (a) recipiente A, (b) recipiente B, (c) recipiente C, (d) recipiente D e (e) Recipiente E

GRUPO II: Recipientes plásticos com prolongado tempo de uso

A Figura 4.7 a-e mostra as concentrações de DBP encontradas nas soluções de simulante que foram aquecidas no forno micro-ondas com os recipientes plásticos do Grupo II em diferentes condições.

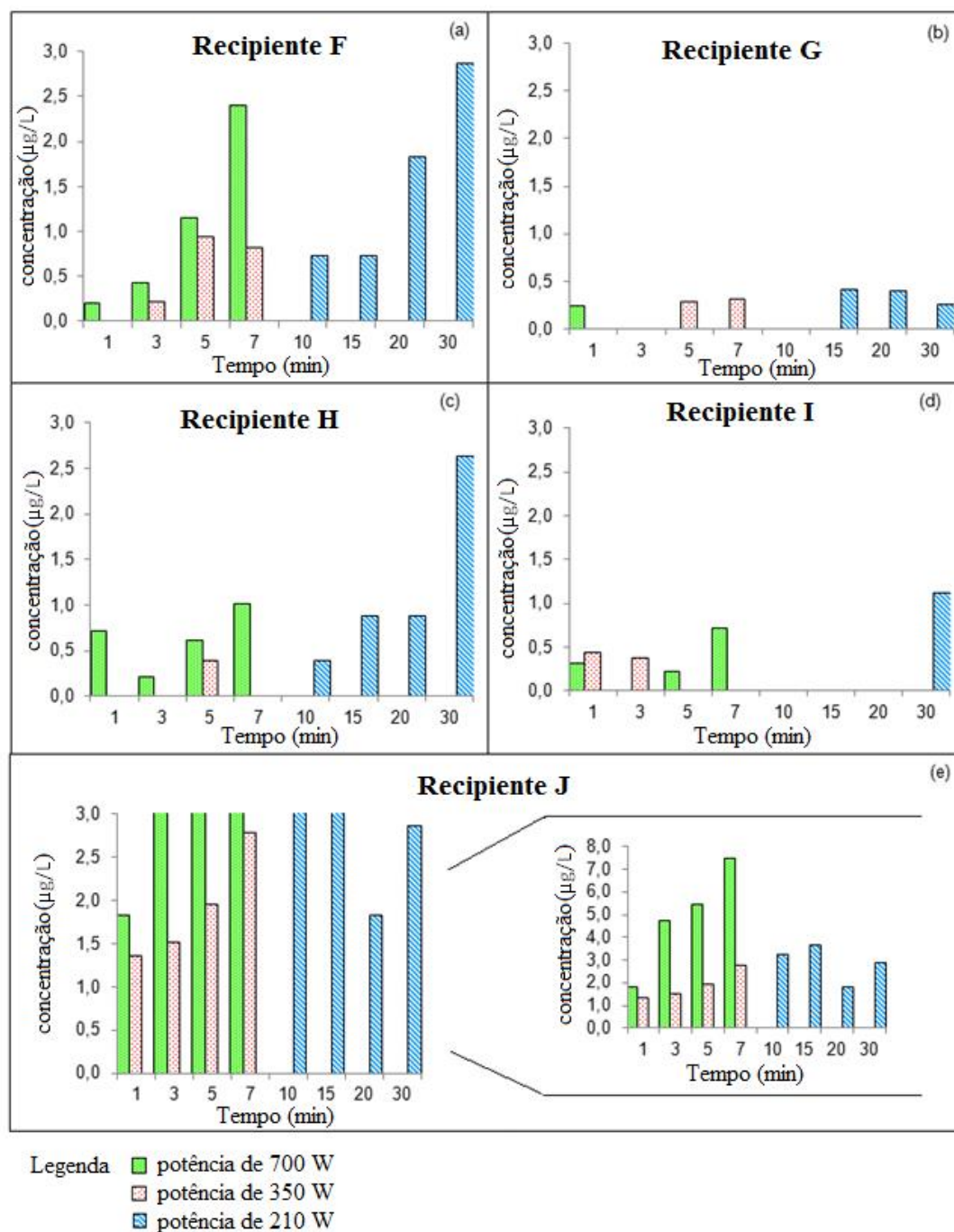


Figura 4. 7: Concentrações de DBP na análise do simulante nas vasilhas do Grupo II submetidos ao aquecimento em forno com radiação micro-ondas: (a) recipiente F, (b) recipiente G, (c) recipiente H, (d) recipiente I e (e) Recipiente J

Os resultados de concentração de DBP observados nos recipientes do Grupo I variaram de 0,2 à 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, ao passo que nos recipientes do Grupo II as concentrações de DBP variaram de 0,2 à 7,5 $\mu\text{g L}^{-1}$. As concentrações de DBP obtidas nos dois grupos foram

comparadas usando ANOVA. Os resultados mostraram que houve uma diferença na concentração média de DBP dos grupos, sendo a média obtida para os recipientes do Grupo II maior que a média obtida para os recipientes do Grupo I. Portanto, pode-se concluir que a liberação de ftalatos a partir de recipientes plásticos aquecidos em fornos com radiação micro-ondas é maior em recipientes plásticos com um prolongado tempo de uso.

Todos os recipientes plásticos foram expostos às mesmas condições de aquecimento, entretanto, é conhecido que a absorção da radiação micro-ondas é influenciada pela composição material do frasco reacional, o qual também é influenciado pela forma e tamanho dos recipientes plásticos. Para avaliar o aquecimento, a temperatura do simulante foi imediatamente medida após à exposição às micro-ondas. Um termômetro foi colocado na amostra, o qual foi agitado para permitir a medição de uma temperatura média. As temperaturas obtidas para o Grupo I e Grupo II são apresentadas nas Figuras 4.8 a-e e Figura 4.9 a-e, respectivamente.

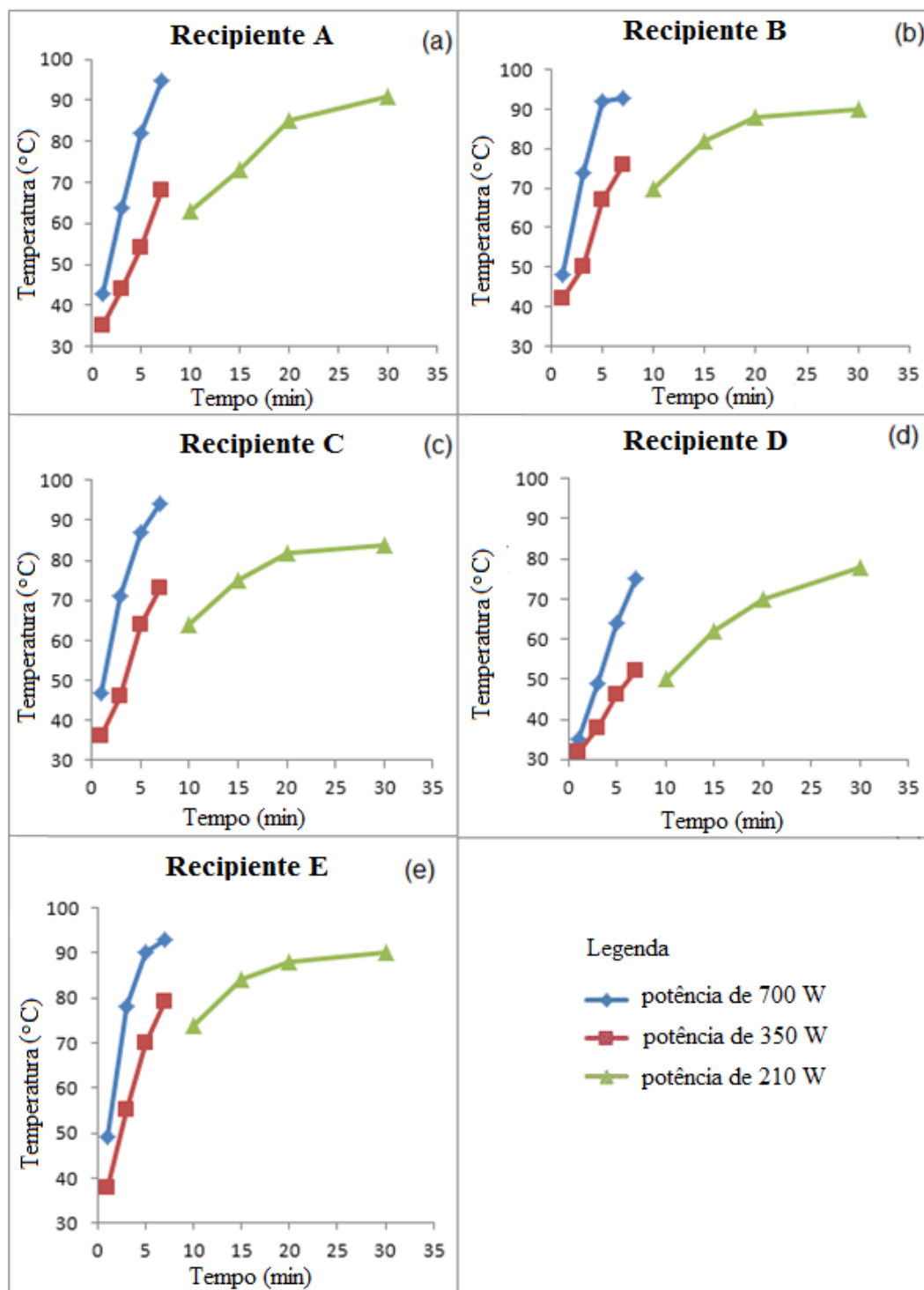


Figura 4.8: Temperaturas de simulantes nos tempos e potências estudadas nos recipientes do Grupo I (a) recipiente A, (b) recipiente B, (c) recipiente C, (d) recipiente D, (e) recipiente E

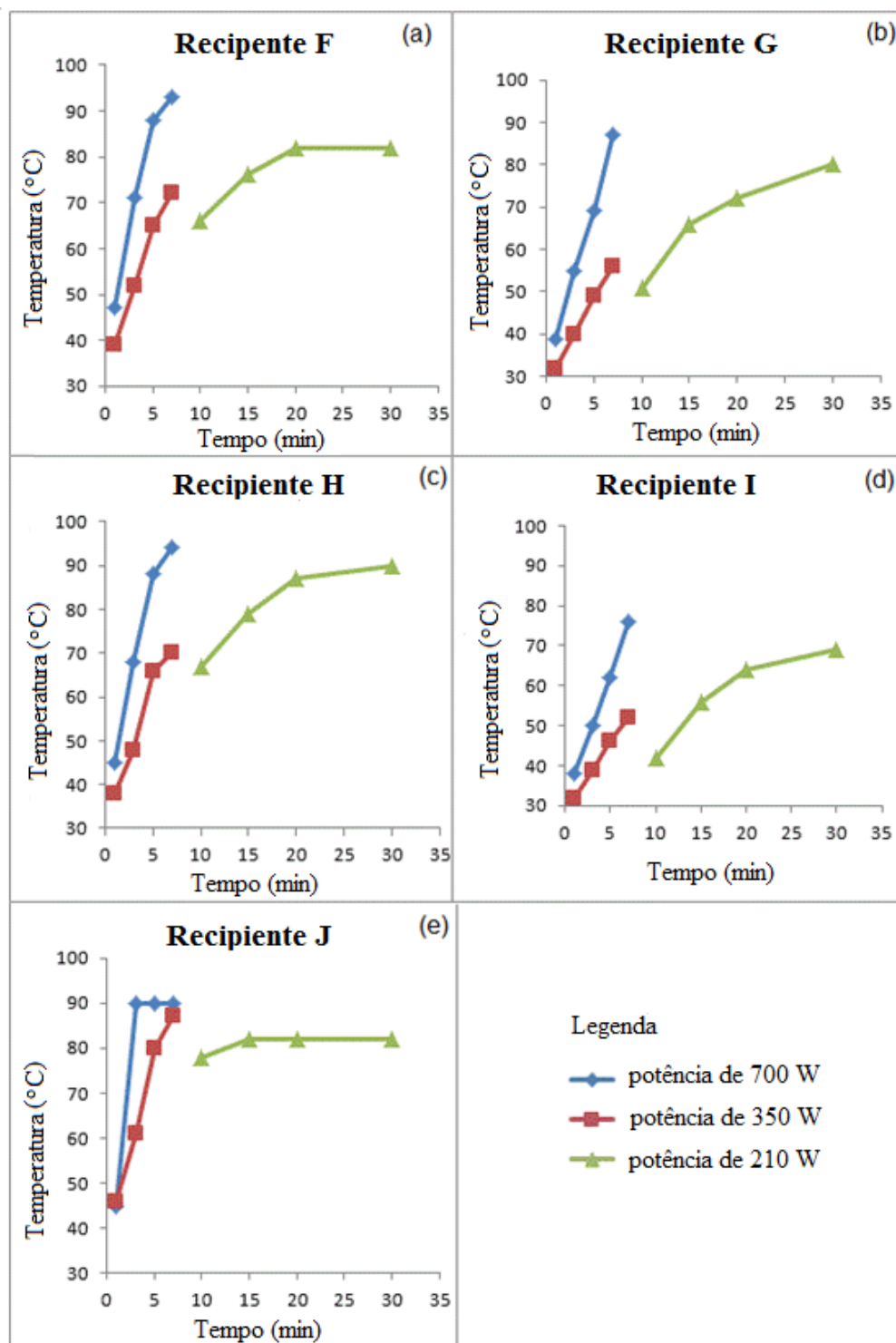


Figura 4.9: Temperaturas de simulantes medidas nos tempos e potências estudadas nos recipientes do Grupo II (a) recipiente F, (b) recipiente G, (c) recipiente H, (d) recipiente I, (e) recipiente J

As Figuras 4.6 e 4.8 mostraram que em recipientes plásticos novos o aumento no tempo de aquecimento influencia o aumento na temperatura, entretanto, não houve uma correlação entre estes fatores e a migração dos ftalatos. Portanto, a migração de DBP para o simulante nos recipientes do Grupo I foi independente das condições de potência e duração do aquecimento utilizados. A variação na concentração de DBP no simulante foi randômica. A maior concentração de DBP ($2,0 \mu\text{g L}^{-1}$) foi observada no recipiente D, entretanto, este valor é menor que o limite específico de migração para o DBP que é de $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$, de acordo com a União Européia (EFSA 2005).

No Grupo II, diferentes concentrações de DBP foram observadas nas amostras. Por meio da comparação entre a migração de ftalatos (Figura 4.7) e a temperatura obtida em cada ensaio de migração (Figura 4.9) foi observado que a migração do ftalato nos recipientes com um prolongado tempo de uso foi dependente da temperatura alcançada durante o aquecimento e do tempo de exposição do recipiente a esta temperatura. A temperatura máxima, por sua vez, foi dependente do tempo de exposição às micro-ondas, volume e forma do recipiente, e potência usada. De uma forma geral, foi observado que, usando níveis de potência de 750 W e 350 W, a temperatura aumentou abruptamente com aumento do tempo. Quando a potência de 210 W foi utilizada, foi observado que a temperatura começou elevada e aumentou ligeiramente com o aumento do tempo de aquecimento. O recipiente J possuía o menor volume entre os recipientes do Grupo II (300 mL) e foi observado uma grande variação de temperatura no intervalo de 1 a 3 min na potência de 700 W. O aquecimento usando esta potência por 3 min resultou em uma temperatura final de $90 \text{ }^\circ\text{C}$. Esta temperatura permaneceu constante por um longo tempo; durante o qual o simulante permaneceu em contato com o recipiente em elevada temperatura o que possivelmente causou o aumento da migração de DBP para o simulante.

Na potência de 350 W a variação da temperatura ocorreu gradualmente e foi observado um aumento da migração de DBP com o aumento da temperatura. Entretanto, a variação na concentração do ftalato na amostra foi menor. Na potência de 250 W, uma pequena variação de temperatura foi observada para os diferentes tempos de exposição; deste modo, não foi observado uma relação linear entre tempo de exposição e migração de DBP. Os recipientes G e I possuíam grandes volumes, 1000 mL e 1200 mL, respectivamente. As menores temperaturas foram medidas nestes recipientes quando comparadas às temperaturas medidas em outros recipientes considerando a mesma potência. Conseqüentemente, uma pequena variação na concentração de DBP foi

observada. De uma forma geral, foi observado que um aumento na temperatura causou um aumento na migração do DBP para o simulante.

Além disso, os resultados obtidos na análise dos recipientes usados sugerem que o aumento na temperatura é a principal causa da migração de DBP. Teoricamente, recipientes usados são inertes, entretanto, estudos mostraram que a migração de várias substâncias químicas pode ocorrer durante o aquecimento por radiação micro-ondas. Um estudo feito por Nerin et al. demonstrou que a liberação de compostos provindos de recipientes plásticos é dependente da temperatura. De acordo com Nerin et al., o aumento da temperatura leva ao aumento na decomposição de aditivos presentes nos plásticos e à quebra da cadeia polimérica, ocasionando a liberação de substâncias químicas provindas da superfície quente dos plásticos (Nerin, Fernandez et al. 2003). Outros estudos indicam que ftalatos podem ser liberados durante o aquecimento em forno micro-ondas. Ftalatos não são comumente utilizados como plastificantes em polipropileno. Entretanto um estudo feito por Jen e Liu determinou uma concentração média de DBP de $32 \mu\text{g L}^{-1}$ em água aquecida por 10 min em um forno micro-ondas, com potência de 500 W, em tigelas de polipropileno (Jen and Liu 2006). Um estudo feito por Gonzales-Castro et al. determinou uma concentração de $0,001 \mu\text{g L}^{-1}$ de DBP em água aquecida em recipientes plásticos para micro-ondas (Gonzalez-Castro, Olea-Serrano et al. 2011). Nestes dois estudos, as condições de análise, como duração de aquecimento e temperatura não foram avaliados.

As características dos alimentos devem ser consideradas na avaliação de migração dos ftalatos. Os ftalatos são lipofílicos e são encontrados em altas concentrações em alimentos gordurosos, tais como azeite de oliva e outros óleos (Cavaliere, Macchione et al. 2008; Nanni, Fiselier et al. 2011). No presente trabalho, as concentrações de DBP determinadas foram similares às concentrações reportadas em alimentos hidrofílicos (Feng, Zhu et al. 2005; Gonzalez-Castro, Olea-Serrano et al. 2011).

Os recipientes plásticos, usados em fornos micro-ondas, são usualmente feitos de polipropileno, no qual o uso de plastificantes não é essencial e sua adição não deve ser intencional. Por isso, testes de migração não são requeridos para embalagens de polipropileno. Entretanto, Shen reportou a presença de ftalatos em concentrações de $1,44 \text{ mg kg}^{-1}$ para o DBP, $0,10 \text{ mg kg}^{-1}$ para o BBP e $8,72 \text{ mg kg}^{-1}$ para o DEHP em recipientes plásticos que são para uso em micro-ondas (Shen 2005). Estes resultados demonstraram que recipientes de polipropileno podem conter plastificantes. Uma possível fonte de

contaminação é o uso do catalisador $\text{TiCl}_4/\text{DBP}/\text{Mg}(\text{OEt})_2$ na fabricação do polipropileno (Ohnishi, Yukimasa et al. 2002). Durante o processo de manufatura do polímero, o catalisador pode sofrer degradação e liberar o DBP no material polimérico. Outra possível fonte de contaminação poderia surgir a partir do contato dos recipientes do Grupo II com alimentos contaminados com ftalatos. O contato frequente com alimentos contaminados pode causar a contaminação dos recipientes quando o uso é prolongado. Muitos estudos mostram que alimentos são contaminados com ftalatos (Casajuana and Lacorte 2004; Del Carlo, Pepe et al. 2008; Cirillo, Fasano et al. 2011). Esta hipótese foi considerada porque as concentrações de DBP em recipientes plásticos do Grupo II foram superiores às concentrações observadas em recipientes do Grupo I.

No presente trabalho, nos dois grupos de recipientes a concentração de DBP foi menor que $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$ (limite específico de migração estabelecido para o DBP) em todas as amostras analisadas. A legislação para regulamentação de ftalatos em várias fontes de exposição não é estabelecida, porque para muitos compostos, mais estudos de avaliação dos efeitos tóxicos a homens e animais são necessários. Com relação aos efeitos sobre a saúde, muitos tipos de alimentos podem ser contaminados por elevadas concentrações de ftalatos durante o processo de fabricação. Assim, existe uma grande necessidade de novos estudos para avaliar a contaminação dos alimentos pelo ftalatos.

4.4 Conclusão

O método desenvolvido neste estudo foi adequado para quantificação de ftalatos presentes em baixas concentrações em amostras líquidas. A principal vantagem da utilização de SPME frente a outros métodos de extração é a ausência de solventes orgânicos durante o preparo da amostra. Alguns compostos orgânicos podem ser tóxicos em baixas concentrações, assim, menores valores de LOQs são requeridos para que seja possível a avaliação destes compostos em amostras que apresentam pequenas quantidades dos ftalatos e outros compostos suspeitos de serem tóxicos para o homem. O uso de SPME com fibra resfriada permitiu a quantificação de ftalatos presentes em baixas concentrações nas amostras porque o uso deste método de extração leva a um aumento da eficiência de extração. A SPME com fibra resfriada pode ser usada para vários outros compostos e potencialmente pode ser aplicada para o estudo de outros compostos orgânicos que estão presentes em níveis traço em diferentes matrizes. O DBP foi encontrado em todas as

recipientes de polipropileno. As análises realizadas mostraram que há uma maior migração de ftalatos em recipientes com um tempo prolongado de uso. Os recipientes deste grupo, apresentavam pequenas deformações devido ao uso prolongado e são menos resistentes ao aquecimento, o qual pode permitir uma maior migração de ftalatos. Os valores encontrados de DBP estão de acordo com a legislação vigente para a migração deste composto, contudo, outros estudos ainda se fazem necessários para avaliar os possíveis efeitos tóxicos e exposição do homem a estes compostos, visto que a ingestão de alimentos aquecidos em forno com radiação micro-ondas é apenas uma das diversas fontes de exposição. O método desenvolvido poderá ser aplicado em amostras reais de alimentos, se estes possuírem as características do simulante utilizado, como mesmo pH, entre outras.

CAPÍTULO 5 – ANÁLISE DA MIGRAÇÃO DE PLASTIFICANTES PARA CARNE ASSADA EM SACOS PLÁSTICOS USANDO SPME E GC/MS

5.1 Aspectos Gerais

Nos últimos anos, novos tipos de embalagens plásticas têm sido produzidas como resultado do avanço tecnológico. Estas novas embalagens plásticas surgiram como uma alternativa para aumentar a conveniência no preparo dos alimentos e estão cada vez mais sendo introduzidas no cotidiano das pessoas. As embalagens são utilizadas em condições que favorecem a migração dos plastificantes presentes nas embalagens para os alimentos, tais como a alta temperatura. Como exemplo pode ser citado o uso de sacos plásticos para assar carne em forno doméstico tradicional, os quais são submetidos à temperaturas de no mínimo 100 °C. O uso de plastificantes em recipientes que entram em contato com alimentos tem sido restrito em muitos países e vários estudos têm mostrado a presença destes compostos em embalagens (EFSA 2005; EFSA 2005; EFSA 2005; Shen 2005; Jen and Liu 2006; Brasil 2008; EU 2011).

Neste estudo um método analítico foi desenvolvido para análise da migração de plastificantes provindos de sacos plásticos para carnes assadas acondicionadas nestas embalagens. As técnicas de microextração em fase sólida com fibra resfriada e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas foram utilizadas para extração e análise dos compostos. Os plastificantes dietilftalato (DEP), benzilbutilftalato (BBP), bis(etilhexil)ftalato (DEHP), bis(etilhexil) adipato (DEHA), dioctilftalato (DOP), dicitclohexilftalato (DCHP), diisobutilftalato (DiBP) e dibutilftalato (DBP) foram identificados e quantificados.

5.2 Materiais e Métodos

5.2.1. Reagentes

A mistura de ftalatos e adipato EPA 506, que contém os padrões de BBP, DEHP, DEHA, DBP, DOP e DEP em isoctano na concentração de 1000 mg L⁻¹, utilizado no desenvolvimento do método analítico foi obtido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Os padrões DiBP e DCHP usados também foram obtidos da Sigma-Aldrich. Uma solução estoque na concentração de 6,0 mg L⁻¹ por composto foi preparada em etanol grau HPLC –

J.T. Baker (Xalostoc, Edo De Mex, Mexico). A fibra de poliacrilato 85 μm utilizada nos experimentos foi obtida da Supelco (Bellefonte, PA, USA), e a água ultra-pura foi produzida em um purificador Elga Purifier – modelo Classic Purelab UVMK2. Os sacos plásticos utilizados foram adquiridos em supermercados de Belo Horizonte. Todos os temperos testados nos experimentos foram temperos que vieram acoplados aos sacos plásticos.

5.2.2. Preparo da Amostra

Para análise da migração dos plastificantes presentes nas embalagens, foi realizado um preparo prévio da amostra de carne de frango. O preparo da amostra incluiu preparo da carne, o qual foi assada, extração e concentração dos analitos. A carne de frango (600 g) foi assada por 1 hora e 20 min em forno elétrico convencional (Arno, potência de 1000 W). Foram feitos três tipos de testes: o frango foi assado com introdução de pedaços de frango e tempero no saco plástico; o frango foi assado com introdução de pedaços de frango no saco plástico sem a adição de tempero; e o frango foi assado em pedaços sem a adição de tempero e sem o uso de saco plástico. As análises foram feitas em duplicata.

Para validação do método a carne foi assada sem saco plástico e sem adição de tempero. Depois de cozida, cada parte do frango (asa, coxa e peito) foi cortada em pequenos pedaços e uma alíquota de 13,0 g de cada parte foi introduzida em um béquer contendo 80,0 mL de água. A amostra foi agitada por 30 min com o uso de agitador magnético. Posteriormente, a amostra foi centrifugada por 20 min e uma alíquota de 19,0 mL foi transferida para um frasco de vidro de 20,0 mL e selada com septos de teflon e lacres de alumínio para extração e concentração dos compostos por microextração em fase sólida com fibra resfriada (CF-SPME). O tempero que vem agregado na mesma embalagem do saco plástico também foi avaliado utilizando o mesmo procedimento. A alíquota de tempero foi de 1,0 g.

5.2.3 Extração dos Analitos

A extração foi conduzida usando a técnica CF-SPME resfriada com nitrogênio líquido (Menezes and Cardeal 2011). Os analitos foram extraídos por imersão direta usando uma fibra de poliacrilato 85 μm . A fibra foi pré-condicionada por 1 hora a 280 $^{\circ}\text{C}$, de acordo com instruções do fabricante.

5.2.4 Otimização das Condições de Extração e Dessorção

Uma otimização multivariada foi usada para determinar as condições ideais da metodologia de extração e dessorção. Para tal, óleo de girassol foi utilizado como simulante, uma vez que os óleos são usados como simulantes para alimentos com características lipofílicas (UE 2011). No processo de otimização, 13,0 g de óleo de girassol foi colocado em um béquer contendo 80,0 mL de solução aquosa de cada plastificante na concentração de 10,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$. A mistura foi agitada por 30 min e, posteriormente, foi mantida em repouso por 10 min. Uma alíquota de 19,0 mL foi retirada do sobrenadante, no qual foi feita a extração utilizando CF-SPME. A avaliação das variáveis da metodologia foi realizada utilizando um planejamento fatorial 2^3 completo com ponto central. Neste experimento, tempo de extração, temperatura de extração (medida no bloco de aquecimento) e tempo de dessorção foram variados em dois níveis: 20 e 40 min, 25 °C e 65 °C, 0,5 e 2,0 min, respectivamente. O ponto central foi analisado em triplicata com os seguintes valores para as variáveis; tempo de extração, 30 min; temperatura de extração, 45 °C; e tempo de dessorção, 1,25 min.

5.2.5 Parâmetros de Mérito

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), precisão intra e inter-ensaios e linearidade foram determinados e avaliados de acordo com as diretrizes da EURACHEM (CITAC/EURACHEM 2002). Para avaliação dos parâmetros de mérito o frango foi assado sem saco plástico e sem tempero. O frango foi posteriormente picado e transferido para um béquer contendo água, o qual foi agitado. O sobrenadante foi separado e soluções padrões dos compostos estudados foram adicionadas ao sobrenadante. A concentração dos plastificantes nas amostras foi determinada utilizando curvas de calibração. A curva de calibração foi construída a partir da análise de padrões em diferentes concentrações: 0,26; 0,52; 1,03; 2,05 e 4,07 $\mu\text{g L}^{-1}$ para DEP, BBP, DEHA e DOP; 0,07; 0,13; 0,26; 0,51; 1,02 e 2,02 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o DiBP; 0,13; 0,26; 0,52; 1,04; 2,07 e 4,11 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o DEHP; 0,07; 0,13; 0,26; 0,52; 1,03 e 2,04 para o DBP; 0,07; 0,12; 0,26; 0,51 e 1,02 para o DCHP. Cada ponto foi determinado em triplicatas independentes. A precisão foi determinada em duas diferentes concentrações (0,2 e 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$). Para o DCHP a precisão foi determinada somente na concentração de 0,2 $\mu\text{g L}^{-1}$. O LOD foi determinado realizando a injeção de dez replicatas do branco. A área utilizada para cálculo do LOD é obtida considerando a média das áreas da injeção dos brancos mais três vezes o desvio. Os resultados de área

foram substituídos na equação da curva de calibração do analito para se obter o valor de concentração do LOD. O LOQ foi determinado como sendo o menor ponto da curva de calibração.

5.2.6 Sistema Cromatográfico

A análise da migração de plastificantes foi conduzida em um cromatógrafo à gás (7890 C – Agilent) acoplado à um espectrômetro de massas equipado com analisador de massas do tipo quadrupolo (5975 C - Agilent). A análise cromatográfica foi conduzida no modo *splitless* por 2 min usando uma coluna HP-5MS Agilent (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm), o injetor foi operado na temperatura de 250 °C com um fluxo de hélio de 1.5 mL min⁻¹. A programação da temperatura da coluna foi 120 °C por 3 min, seguida de aumento para 190 °C a 20 °C min⁻¹, mantida por 4 min, aumento para 250 °C a 2 °C min⁻¹, mantida por 1 min e aumento final para 280 °C a 20 °C min⁻¹, mantida por 1 min. O tempo total de corrida foi de 44 min. A análise foi conduzida simultaneamente no modo SCAN (no qual todas os íons gerados são analisados) e SIM (*Single Ion Monitoring* – no qual alguns íons são selecionados para análise) usando ionização por elétrons com energia de 70 eV. A Tabela 5.1 apresenta os íons monitorados no modo SIM.

Tabela 5. 1: Íons monitorados no modo SIM na análise de plastificantes

Composto	Íon (m/z)
DEP	149, 150, 177
DiBP	149, 104, 205
DBP	149, 205, 223
BBP	149, 91, 206
DEHA	129, 112
DCHP	149, 167, 249
DEHP	149, 167, 71
DOP	149, 279, 43

5.3 Resultados e Discussão

5.3.1. Otimização das Condições de Extração e Dessorção

Os resultados obtidos no planejamento fatorial foram avaliados utilizando o software Statistica v.8. Os parâmetros significativos no processo de extração e dessorção foram

avaliados utilizando gráficos de Pareto (Figura 5.1). Todos os parâmetros foram avaliados em um intervalo de 95% de confiança.

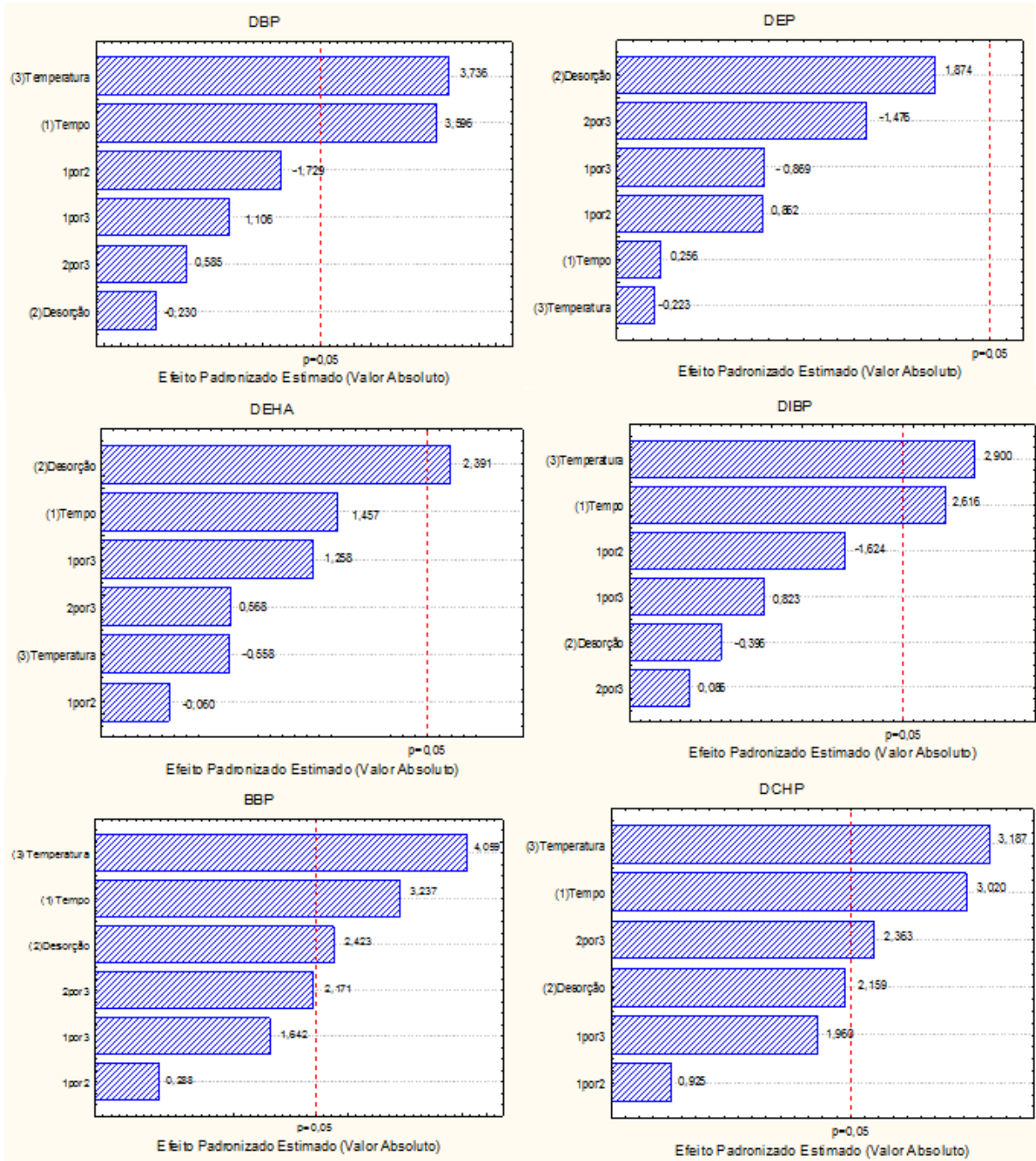


Figura 5. 1: Gráficos de Pareto obtidos a partir do planejamento experimental (a) DBP, (b) DEP, (c) DiBP, (d) BBP, (e) DEHA, (f) DCHP, (g) DEHP, (h) DnOP

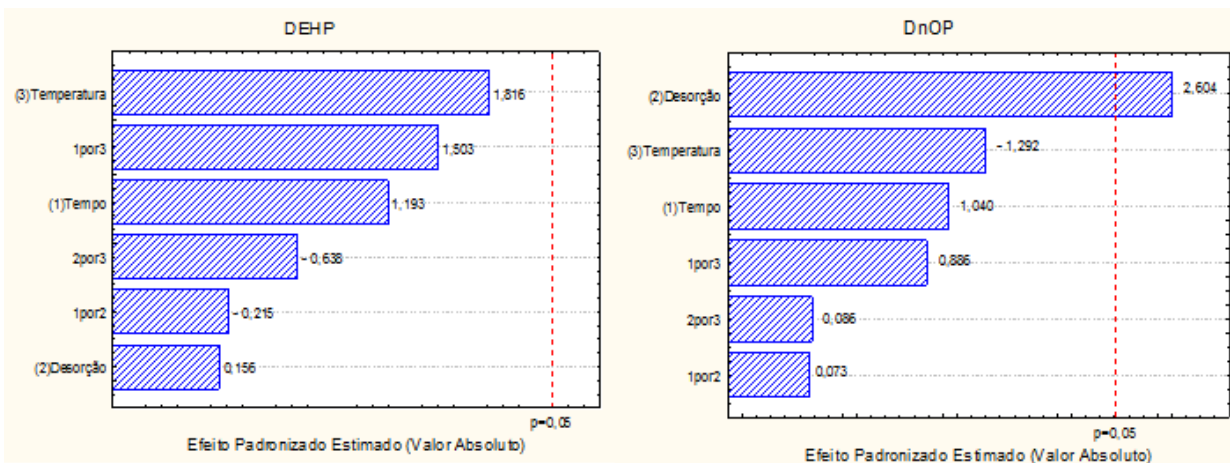


Figura 5.1 cont: Gráficos de Pareto obtidos a partir do planejamento experimental (a) DBP, (b) DEP, (c) DiBP, (d) BBP, (e) DEHA, (f) DCHP, (g) DEHP, (h) DnOP

A partir da análise dos gráficos observa-se que o aumento da temperatura e do tempo aumentam a eficiência de extração para DiBP, DBP, BBP e DCHP. O aumento do tempo de dessorção aumenta a eficiência para o BBP, DEHA e DOP. A interação entre duas variáveis também foi avaliada, contudo esta interação só foi significativa para o DCHP no qual a interação entre o aumento da temperatura e aumento do tempo de dessorção resulta em um aumento na eficiência. De forma geral, uma maior eficiência foi obtida quando o tempo de 40 min, temperatura do bloco de aquecimento de 65 °C e tempo de dessorção de 2 min foram empregados e, portanto estes parâmetros foram adotados na análise dos plastificantes. O cromatograma obtido usando as condições otimizadas de extração é mostrado na Figura 5.2.

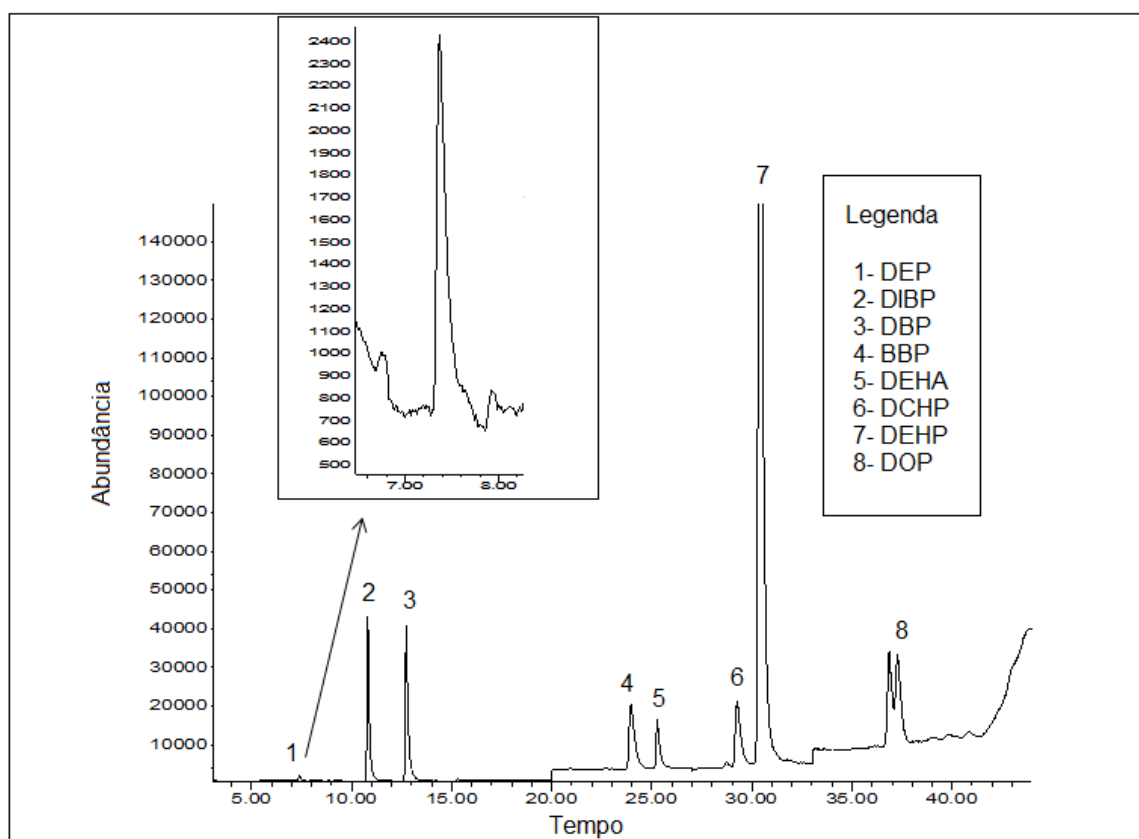


Figura 5. 2: Cromatograma de massas dos compostos estudados por GC/MS, modo SIM

5.3.2 Parâmetros de Mérito

A linearidade das curvas de calibração foi avaliada utilizando testes estatísticos de normalidade de resíduos (Ryan-Joiner), independência de resíduos (Durbin-Watson), homocedasticidade de resíduos (Brown-Forsythe), significância da regressão e desvio da linearidade (ANOVA) (de Souza and Junqueira 2005). Os testes realizados mostraram que os resíduos são independentes, seguem a distribuição normal e possuem homocedasticidade. O teste ANOVA mostrou que a regressão foi significativa e não houve desvio da linearidade, portanto a regressão linear pode ser utilizada para quantificação dos plastificantes. Os resultados obtidos na análise dos parâmetros de mérito são apresentados na Tabela 5.2.

Tabela 5. 2: Equações e coeficientes de determinação dos plastificantes

Compostos	Faixa Linear ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Equação	Coefficiente de Determinação (R^2)
DEP	0,26 - 4,07	$y = 21045x + 25125$	0,9826
DiBP	0,07 - 2,02	$y = 973062x + 906190$	0,9655
DBP	0,07 - 2,04	$y = 1.090.514x + 321.312$	0,9855
BBP	0,26 - 4,07	$y = 817297x + 42548$	0,9991
DEHA	0,26 - 4,09	$\sqrt{y} = 231.42x + 336.85$	0,9749
DCHP	0,07 - 1,02	$y = 535771x - 18778$	0,9781
DEHP	0,13 - 4,11	$y = 8.775.000x + 2.559.677$	0,9821
DnOP	0,26 - 4,01	$\sqrt{y} = 415.63x + 388.8$	0,9774

Os resultados de LOD, LOQ, precisão intra e inter-ensaio obtidos são apresentados na Tabela 5.3

Tabela 5. 3: Precisão, limites of detecção, e limites de quantificação dos plastificantes (n =10)

Composto	Precisão – intra-ensaio		Precisão – inter-ensaio		LOD $\mu\text{g Kg}^{-1}$	LOQ $\mu\text{g Kg}^{-1}$
	0,2 $\mu\text{g Kg}^{-1}$	2,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$	0,2 $\mu\text{g Kg}^{-1}$	2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$		
	CV %		CV %			
DEP	7	11	12	14	0,13	0,26
DiBP	19	8	18	15	0,02	0,07
DBP	9	8	24	18	0,01	0,07
BBP	16	9	33	14	0,18	0,26
DEHA	18	20	17	17	0,03	0,13
DCHP	12		31		0,04	0,07
DEHP	16	24	26	21	0,08	0,13
DOP	16	26	23	23	0,16	0,26

CV: coeficiente de variação

Os valores de LOD determinados neste estudo usando CF-SPME foram superiores ou similares aos valores determinados na literatura. Em um estudo, no qual ftalatos foram determinados em vinhos, os LODs variaram de 0,10 a 0,15 mg L^{-1} quando SPE foi utilizado como técnica de extração (Del Carlo, Pepe et al. 2008). Em um estudo realizado por Feng et al. para análise de ftalatos em leite com 2 % de gordura, no qual HS-SPME foi utilizada como técnica de extração, os LODs obtidos variaram de 0,04 a 1,5 ng g^{-1} (Feng, Zhu et al. 2005). De uma forma geral, os coeficientes de variação foram menores que 20 %.

5.3.3 Determinação dos plastificantes em carne de frango e tempero em contato com sacos plásticos usados no cozimento de carnes

A carne de frango foi assada utilizando diferentes modos de preparo como descrito no item 5.2.2. Duas marcas de sacos plásticos usados comercialmente foram avaliadas e para cada marca dois tipos de temperos que são comprados agregados ao saco plástico foram avaliados. Em cada frango assado, foi retirada uma alíquota de 13 g em três diferentes partes do frango. Além das amostras de carne, uma alíquota de 1 g de tempero foi analisada. Foram retiradas amostras do peito, asa e coxa do frango. Somente dois ftalatos, DiBP e DBP, foram encontrados nas amostras de carne. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 5.4

Tabela 5. 4: Concentrações de plastificantes determinados em amostras de carne de frango assada

Saco plástico 1 com tempero 1			Saco plástico 2 com tempero 3		
	DiBP	DBP		DiBP	DBP
	$\mu\text{g kg}^{-1}$			$\mu\text{g kg}^{-1}$	
asa	2,73 ± 2,60	0,44 ± 0,24	asa	0,89 ± 0,66	0,45 ± 0,22
coxa	1,87 ± 2,21	0,36 ± 0,21	coxa	0,28 ± 0,14	0,26 ± 0,06
peito	1,34 ± 1,47	0,34 ± 0,15	peito	1,31 ± 1,58	0,72 ± 0,64
tempero	12,87 ± 0,67	4,64 ± 1,65	tempero	35,72 ± 3,97	21,36 ± 11,28
Saco plástico 1 com tempero 2			Saco plástico 2 com tempero 4		
asa	0,34 ± 0,47	0,24 ± 0,16	asa	0,69 ± 0,01	0,52 ± 0,06
coxa	0,64 ± 0,91	0,34 ± 0,23	coxa	1,07 ± 1,50	0,47 ± 0,38
peito	0,06 ± 0,08	0,26 ± 0,06	peito	0,30 ± 0,10	0,87 ± 0,04
tempero	17,96 ± 0,25	12,96 ± 2,17	tempero	19,99 ± 9,81	19,07 ± 0,62
Saco plástico 1 sem tempero			Saco plástico 2 sem tempero		
asa	0,19	0,24	asa	0,13	0,2
coxa	<LOD	0,06	coxa	<LOD	0,16
peito	<LOD	0,09	peito	<LOD	0,21
Carne de frango sem saco e sem tempero					
	DiBP	DBP			
	$\mu\text{g kg}^{-1}$				
asa	<LOD	0,04			
coxa	0,15	0,15			
peito	<LOD	0,08			

Os ftalatos DiBP e DBP foram encontrados na maioria das amostras de carne de frango analisadas. As amostras de carne, no qual frango foi assado com tempero no saco plástico, apresentaram concentrações de 0,01 a 4,57 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para DiBP e 0,1 a 1,17 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para DBP. Os plastificantes DiBP e DBP foram determinados em todas as amostras de tempero analisadas nas concentrações de 12,39 a 38,52 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 3,47 a 29,33 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. As amostras de carne de frango assadas no saco plástico sem a adição de tempero, apresentaram concentrações de DBP variando de 0,06 a 0,24 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Nestas condições, o DiBP foi determinado em algumas amostras em concentrações que variaram de 0,13 a 0,19 $\mu\text{g kg}^{-1}$. As concentrações destes ftalatos foram semelhantes as concentrações encontradas quando o frango foi assado sem tempero e sem o uso de saco plástico, ou seja de 0,04 a 0,15 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o DBP e 0,15 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o DiBP. De acordo com os resultados obtidos em cada uma das condições foi observado que as concentrações dos ftalatos nas amostras foram semelhantes quando o frango foi assado somente com saco plástico e quando o frango foi assado sem saco plástico. Entretanto, quando tempero foi adicionado ao frango que foi assado no saco plástico as concentrações de DiBP e DBP foram maiores. As análises dos temperos mostraram que as concentrações destes compostos são relativamente altas nestas amostras. De uma forma geral, foi observado que as concentrações de ftalatos nas amostras aumentaram com a adição do tempero. Portanto pode-se dizer que a presença de ftalatos nas amostras de carne não foi devido a migração de plastificantes contidas no saco plástico e sim devido à adição do tempero no momento do preparo da carne. Este fato poderia ser explicado pela própria contaminação do tempero no momento da fabricação, devido ao uso de materiais plásticos na indústria.

A contaminação de alimentos por ftalatos é citada em diversos estudos. Em um estudo feito por Cirillo et al., no qual ftalatos foram determinados em diversos alimentos, a concentração de DBP em temperos (condimentos) foi de 7,5 a 19,2 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Em outro estudo conduzido por Schecter et al., as concentrações de ftalatos em condimentos variaram de 0,81 a 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o DiBP e 1,6 a 15,4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o DBP (Schecter, Lorber et al. 2013). A concentração de ftalatos determinados em alimentos apresenta uma grande variação. Em um estudo feito por Feng and Zhu, para determinar ftalatos em leite de vaca, as concentrações de DBP and DEHP foram de 4,07 a 9,79 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 8,40 a 282,90 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente (Feng, Zhu et al. 2005). Em outro estudo feito por Casajuana e Lacorte, analisando amostras de leite, DBP and DEHP foram determinados em concentrações que variaram de 7,30 a 50,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 15,1 a 27,2 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente (Casajuana and

Lacorte 2004). Em um estudo realizado por Fan et al., no qual alimentos fritos feitos de farinha foram colocados em contato com embalagens plásticas e de papel, as concentrações de ftalatos variaram de 0,8 a 52,4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o DEP, 62,0 a 42806,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o DiBP, e 84,2 a 16027,2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o DBP (Fan, Wu et al. 2012). Esta variação ocorre devido as condições de fabricação e armazenamento do alimento. Além disso, as características do alimento também podem influenciar na contaminação por estes compostos. Alimentos gordurosos normalmente possuem maior concentração de ftalatos, devido as características lipofílicas destes compostos. DBP e DEHP foram determinados em concentrações de 22 a 360 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 77 a 1643 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente, em amostras de óleos vegetais comerciais (Nanni, Fiselier et al. 2011). Em um estudo realizado por Cavaliere et al. as concentrações de ftalatos determinadas em azeite de oliva foram de < 149 a 490 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o DBP, < 168 a 4700 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para DEHP, < 48 a 1750 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o BBP e < 148 para o DEP e < 4,6 para o DOP (Cavaliere, Macchione et al. 2008) .

A união européia estabelece um limite específico de migração de 0,3 mg kg^{-1} para o DBP. Neste estudo as concentrações para este composto variaram de <LOD (0,01) a 29,33 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Portanto, em todas as amostras analisadas as concentrações determinadas de ftalatos estão de acordo com a legislação europeia (EU 2011).

5.4 Conclusões

Os plastificantes são encontrados em uma grande variedade de alimentos e podem ser tóxicos mesmo em baixas concentrações. Por isso, o desenvolvimento de métodos com baixos limites de quantificação são requeridos para sua identificação. O método desenvolvido foi adequado para a quantificação dos compostos estudados e permitiu a quantificação de plastificantes ftalatos comumente usados em embalagens de plásticos e utensílios. A CF-SPME é uma técnica que possui como vantagem a não utilização de solventes orgânicos. Em adição a esta vantagem, usando esta técnica, são obtidos baixos limites de detecção e de quantificação. Os compostos DiBP e DBP foram encontrados na maioria das amostras; no entanto, a presença destes compostos em frango assado é devido à adição de temperos durante o preparo da carne. As amostras de tempero analisadas apresentaram maiores concentrações de plastificantes do que as amostras de carne. Portanto, pode-se concluir que a carne sofre contaminação dos plastificantes devido à adição de tempero no processo de preparo, pois quando esta foi analisada sem tempero e

no saco plástico a concentração de plastificantes foi baixa. Entretanto, quando o tempero, que foi previamente analisado foi adicionado as concentrações dos plastificantes foi maior na carne. A análise do tempero mostrou que estes possuem concentrações maiores de plastificantes. As concentrações dos ftalatos determinados nas amostras analisadas de frango e tempero estão abaixo do limite estabelecido pela legislação europeia.

CAPÍTULO 6: ANÁLISE DE PLASTIFICANTES E ALQUILFENÓIS EM VEGETAIS USANDO SPME E CROMATOGRAFIA À GAS BIDIMENSIONAL ABRANGENTE

6.1 Aspectos Gerais

Vários ftalatos e alquilfenóis podem ser encontrados em alimentos, incluindo os vegetais. Vegetais são ingeridos diariamente pelas pessoas e por isso a presença destes compostos nestes alimentos pode ser considerada uma fonte de exposição ambiental crítica. Estudos comprovam a presença de alquilfenóis e ftalatos em vegetais. A contaminação pode ocorrer durante o cultivo, processamento e/ou armazenamento. No cultivo a contaminação pode ocorrer devido a presença destes compostos em agrotóxicos e devido a contaminação do meio ambiente. Os alquilfenóis e ftalatos estão presentes em baixas concentrações em matrizes alimentares e por isso métodos de alta sensibilidade são requeridos. A análise de alquilfenóis e ftalatos é comumente feita utilizando a técnica de cromatografia à gás tradicional (Lopez-Darias, Pino et al. 2010; Liu, Tian et al. 2013; Mousa, Basheer et al. 2013). Uma alternativa ao uso de cromatografia à gás convencional é o uso da cromatografia a gás bidimensional abrangente (GCxGC). A GCxGC tem sido aplicada para análise de compostos orgânicos em diversas matrizes, contudo, poucos estudos citam o seu uso na análise de plastificantes e alquilfenóis em matrizes alimentares.

Neste estudo, foi desenvolvido um método analítico para determinação de dibutilftalato (DBP), benzilbutilftalato (BBP), 4-octilfenol (4-OP), 4-tert-octilfenol (t-OP), 4-nonilfenol (4-NP) e 4-tert-butilfenol (t-OP), em vegetais congelados os quais ficam armazenados em embalagens plásticas para serem comercializados. A extração dos compostos foi feita utilizando SPME convencional seguida da análise por GCxGC-FID.

6.2 Materiais e Métodos

6.2.1 Reagentes

Os compostos DBP, BBP, 4-NP, 4-OP, t-OP e t-BP foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Uma solução estoque de cada padrão foi preparada em uma concentração de 2000,0 mg L⁻¹ usando metanol grau HPLC (Merck - Darmstadt, Germany) como solvente. A água ultra-pura utilizada foi obtida em purificador Diwer Technologies -

modelo W1. A fibra de poliacrilato 85 μm (PA) usada no experimento foi obtida da Supelco (Bellefonte, PA, USA).

6.2.2 Amostras

Foram analisadas amostras de legumes congelados comercializados acondicionados em sacos plásticos. As amostras foram adquiridas em supermercados de Almada/Portugal. Foram analisadas amostras de batata, cenoura e milho. Foram adquiridos vegetais de dois fabricantes diferentes para cada vegetal.

6.2.3 Preparo da amostra

Foram pesados 15,0 g de cada vegetal em pedaços. As amostras foram adicionadas a um béquer contendo 40,0 mL de água e 2,0 mL de metanol, a mistura foi então agitada por um período de 30 min utilizando um agitador magnético. Posteriormente o béquer foi mantido em repouso por 10 min. Uma alíquota de 15,0 mL do sobrenadante foi transferida para um frasco de extração.

6.2.4 Extração dos Analitos

A extração foi realizada utilizando o método de microextração em fase sólida por imersão direta de forma manual, utilizando uma fibra de poliacrilato de 85 μm . Uma alíquota de 15,0 mL do sobrenadante foi transferido para um frasco de SPME, o qual continha uma barra magnética para agitação. As condições de tempo e temperatura de extração foram escolhidos de acordo com a otimização descrita no item 4.3.1. Foi utilizado SPME na forma convencional. A extração foi feita utilizando uma temperatura de 65 °C (medida no bloco de aquecimento) e tempo de 30 min.

6.2.5 Sistema Cromatográfico

As análises foram realizadas em um sistema GCxGC (Agilent – Modelo 7890) equipado com um modulador criogênico com jato de dois estágio e detector por ionização em chamas (FID). O período de modulação foi de 5 s e a duração do pulso quente foi de 300 ms. A análise foi feita no modo splitless por 2 min. A temperatura do injetor foi mantida à 250 °C. O gás de arraste utilizado foi hélio com um fluxo de 1,5 mL min⁻¹. Na primeira dimensão foi utilizada uma coluna Restek Rtx 5 (5 % difenil/95 % dimetil polisiloxana) (10 m \times 0,18 mm \times 0,20 μm) e na segunda dimensão foi utilizada uma coluna Agilent DB17 (50 % fenil/50 % metilpolisiloxana) (1,35 m \times 0,10 mm \times 0,10 μm).

Na primeira coluna a temperatura inicial foi de 60 °C por 1 min, com aumento para 170 °C a 10 °C min⁻¹, mantida por 2 min, e aumento final para 280 °C a 20 °C min⁻¹, mantida por 0,5 min. Na segunda coluna a temperatura inicial foi de 80 °C por 1 min, com aumento para 185 °C a 10 °C min⁻¹, mantida por 2,5 min, e aumento final para 285 °C a 20 °C min⁻¹, mantida por 0,5 min. A temperatura do modulador foi mantida a 100 °C (40 °C acima da temperatura da primeira coluna). Os dados foram analisados no software Leco Chroma TOF GC×GC-FID.

6.2.6 Parâmetros de Mérito

Os parâmetros de mérito do método foram avaliados de acordo com o guia da EURACHEM (EURACHEM 2002). Foram avaliados, linearidade, precisão inter e intra-ensaio, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ). A curva de calibração foi construída em seis diferentes concentrações em um intervalo de 0,5 a 6,0 µg L⁻¹ para t-BP, 4-NP, 4-OP e BBP e de 0,2 a 6,0 µg L⁻¹ para DBP e t-OP. A análise foi feita em triplicata. A precisão intra e inter ensaio foi avaliada em duas diferentes concentrações (1,0 e 5,0 µg L⁻¹). O LOD foi determinado através dos dados de injeção de 10 replicatas do branco e da curva de calibração. O menor ponto da curva de calibração foi considerado como LOQ.

6.3 Resultados e Discussões

6.3.1 Parâmetros de Mérito

A análise dos compostos por GC×GC-FID foi feita em concentrações que variaram de 0,5 a 6,0 µg L⁻¹ para o t-BP, 4-NP, 4-OP e BBP e 0,2 a 6,0 µg L⁻¹ para o t-OP and DBP. As análises foram feitas em triplicatas independentes. O diagrama de contorno obtido para os compostos estudados é apresentado na Figura 6.1

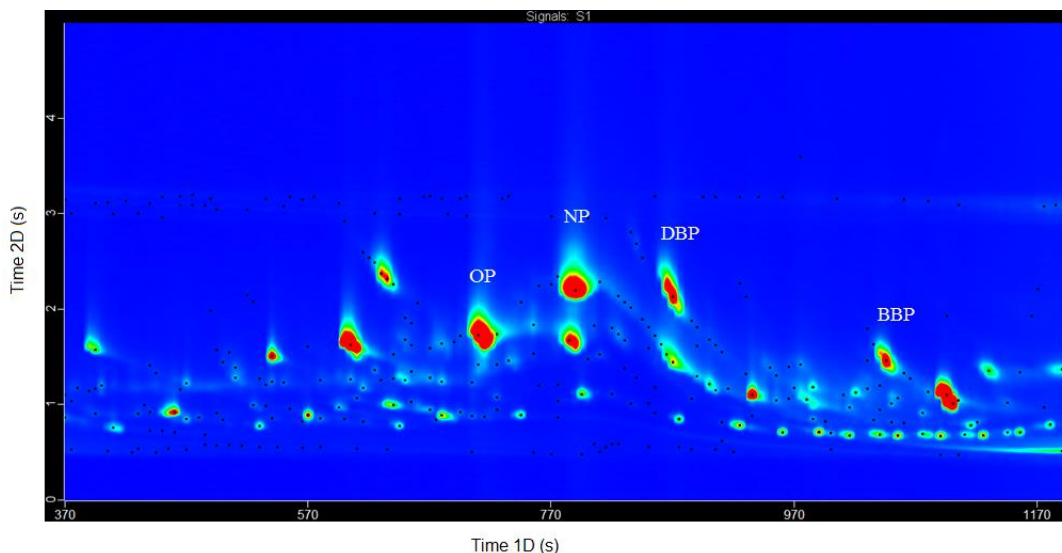


Figura 6. 1: Diagrama de contorno obtido por GCxGC-FID de alquilfenóis e plastificantes extraídos por SPME; modulador criogênico, período de modulação foi de 5 s

A linearidade da curva de calibração foi avaliada utilizando-se os seguintes testes estatísticos: normalidade de resíduos (Ryan-Joiner), independência dos resíduos (Durbin-Watson), homogeneidade dos resíduos (Brown-Forsythe), significância da regressão (ANOVA) e desvio da linearidade (ANOVA) (de Souza and Junqueira 2005). Os resultados dos testes estatísticos aplicados mostraram que os resíduos eram normais, homocedásticos e independentes para todos os compostos, exceto para o t-BP que apresentou resíduos heterocedásticos. Para os resíduos homocedásticos foi utilizada para construção das curvas de calibração o Método dos Mínimos Quadrados Ordinários. Para os resíduos heterocedásticos foi utilizado na construção das curvas o Método dos Mínimos Quadrados Ponderados. O teste ANOVA mostrou que não houve desvio da linearidade e a regressão foi significativa. As equações de reta obtidas e os respectivos coeficientes de determinação (R^2), bem como os demais parâmetros de método avaliados são apresentadas na Tabela 6.1.

Tabela 6. 1: Parâmetros de mérito obtidos

Composto	Equação	R ²	LOD µg L ⁻¹	LOQ µg L ⁻¹	Precisão			
					1,0 µg L ⁻¹		5,0 µg L ⁻¹	
					Intra	Inter	Intra	Inter
					CV (%)			
t-BP	$y = 1,1 \times 10^6 x + 83079$	0,9891	0,21	0,50	17,4	19,31	6,9	8,5
t-OP	$y = 8,0 \times 10^6 x + 644462$	0,9906	0,08	0,20	14,4	15,9	9,5	11,4
4-OP	$y = 1,1 \times 10^7 x + 81382$	0,9895	0,14	0,50	12,9	18,9	11,6	13,0
4-NP	$y = 9,3 \times 10^6 x - 12089670$	0,9893	0,32	0,50	18,5	17,4	16,3	15,8
DBP	$y = 4,0 \times 10^6 x + 86373$	0,9894	0,07	0,20	16,0	11,7	12,5	15,2
BBP	$y = 3,4 \times 10^6 x - 207092$	0,9892	0,26	0,50	26,0	28,4	15,7	18,4

CV: coeficiente de variação

Os valores de coeficiente de variação obtidos para os compostos analisados foram menores que 20,0 %, exceto para o BBP que apresentou CV de 26,0 e 28,4 % na menor concentração. Provavelmente, o BBP apresentou um maior coeficiente de variação devido a uma menor sensibilidade da técnica na análise deste composto em baixas concentrações. De uma forma geral, os valores de precisão obtidos na concentração de 1,0 µg L⁻¹ são menores mostrando uma maior variabilidade em concentrações menores. O teste ANOVA, em um intervalo de 95% de confiança, foi utilizado para comparação dos resultados de precisão obtidos para as duas concentrações avaliadas nos ensaios intra e inter dias. Os resultados obtidos mostraram que na concentração de 5,0 µg L⁻¹ as médias e desvios-padrões dos ensaios intra e inter dias são estatisticamente iguais para todos os compostos avaliados. As médias e desvios-padrões também foram estatisticamente iguais, para os compostos estudados na concentração 1,0 µg L⁻¹, exceto para o DBP. Para este composto, o teste indicou que as médias das áreas obtidas são diferentes nos ensaios intra e inter dias.

Os LODs determinados neste estudo (0,07 a 0,32 µg L⁻¹) são semelhantes aos reportados em outros estudos na análise dos alquilfenóis e plastificantes em alimentos (Lu, Wu et al. 2013; Cinelli, Avino et al. 2014). Os LOQs de 0,20 a 0,50 µg L⁻¹ e os resultados de precisão mostraram que o método pode ser aplicado para análise dos alquilfenóis e ftalatos estudados em baixas concentrações.

6.3.2 Análise de Vegetais por GCxGC-FID

O uso de GCxGC-FID tem-se mostrado uma alternativa eficiente na análise de alquilfenóis e plastificantes. Foi observado que na primeira dimensão diversos compostos presentes na amostra possuem o mesmo tempo de retenção dos analitos (Figura 6.2). Na

cromatografia unidimensional uma coeluição de interferentes e analitos poderia ocorrer, prejudicando a real quantificação dos compostos de interesse. O uso de uma segunda coluna permitiu uma separação mais eficiente dos picos, eliminando a co-eluição.

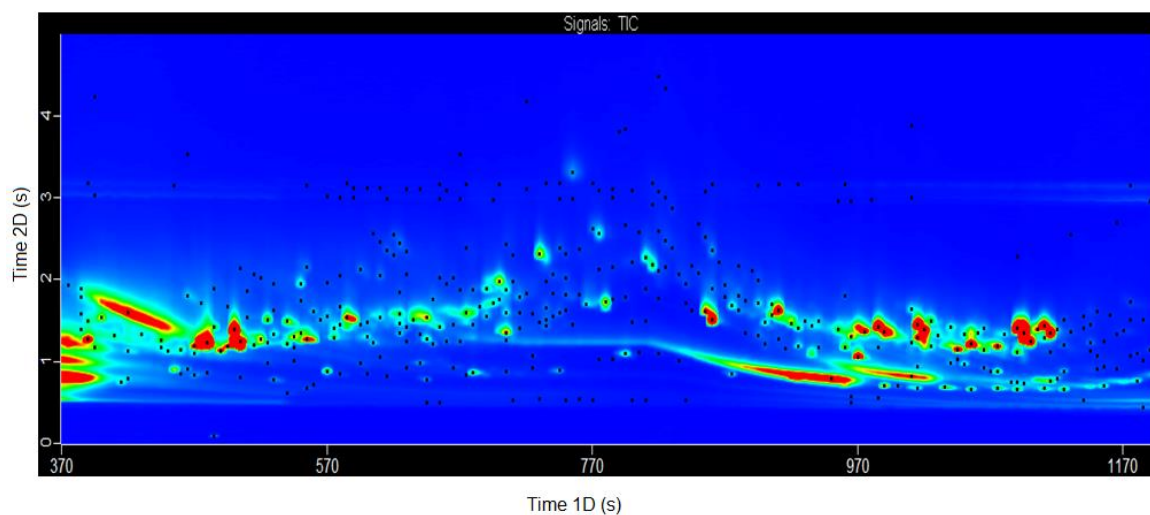


Figura 6. 2: Diagrama de contorno obtido por GCxGC-FID em uma amostra de cenoura; modulador criogênico, período de modulação foi de 5 s

Os alquilfenóis e plastificantes foram avaliados em amostras de cenoura, batata e milho de duas diferentes marcas. Os vegetais foram adquiridos em embalagens de 500 g e duas embalagens (A e B) de cada amostra foram avaliadas. As concentrações obtidas para cada um dos vegetais são apresentadas na Tabela 6.2.

Tabela 6. 2: Concentrações de alquilfenóis e plastificantes determinadas em amostras de vegetais

Composto	Cenoura				Milho				Batata			
	Marca 1		Marca 2		Marca 1		Marca 2		Marca 1		Marca 2	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
	($\mu\text{g kg}^{-1}$)											
t-BP	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
t-OP	0,6	0,6	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
4-OP	<LOQ	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ
4-NP	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
DBP	0,5	1,0	0,4	0,5	0,6	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
BBP	2,5	2,0	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ

<LOD: abaixo do limite de detecção; <LOQ: abaixo do limite de quantificação

As concentrações dos alquilfenóis e plastificantes encontrados nas amostras foram dependentes do composto e do vegetal avaliado. Os compostos t-BP e 4-NP não foram determinados em nenhuma das amostras estudadas. O composto 4-OP foi observado em amostras de cenoura e batata, contudo a sua quantificação não foi possível, pois os valores de concentrações determinados estavam abaixo do limite de quantificação. DBP foi determinado em todas as amostras estudadas, contudo, somente nas amostras de cenoura e em uma amostra de milho, a área obtida foi suficiente para a quantificação. t-OP e BBP foram quantificados somente em amostras de cenoura.

Dentre os vegetais estudados a cenoura apresentou maior número de compostos estudados e as maiores concentrações, contudo, os valores determinados ($0,4$ a $1,0 \mu\text{g kg}^{-1}$) estão abaixo do limite de migração estabelecido para o DBP e BBP. A União Europeia estabelece que o limite específico de migração do DBP e BBP é $0,3$ e $30,0 \text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente (UE 2011). Uma provável fonte de contaminação das cenouras é a migração destes compostos presentes na embalagem para o alimento. As características do alimento pode facilitar que esta migração ocorra. Poucos estudos reportam a análise de alquilfenóis e ftalatos em vegetais, contudo, nos estudos realizados a variação de concentração dos compostos nos alimentos é alta. No estudo realizado por Cacho et al.

para a análise de sete vegetais (alface, milho, rúcula, salsa, acelga, alcachofra em conserva, cogumelo em conserva), OP e DBP foram encontrados somente em amostras de alcachofras em conserva na concentração média de $2,3 \pm 0,2 \mu\text{g Kg}^{-1}$ e DBP foi determinado em amostras de alface na concentração média de $13,8 \pm 0,7 \mu\text{g Kg}^{-1}$ (Cacho, Campillo et al. 2012). She et al. determinaram concentrações médias de $21,59 \pm 2,3 \mu\text{g Kg}^{-1}$, $33,39 \pm 1,4 \mu\text{g Kg}^{-1}$ e $72,5 \pm 1,9 \mu\text{g Kg}^{-1}$ de NP em repolho, pepino e milho, respectivamente (She, Wang et al. 2012). Em outro estudo realizado por Shen et al., 16 ftalatos foram determinados em vegetais de folha cultivados no sul da China e a concentração média encontrada foi de $236,93 \text{ mg kg}^{-1}$ de peso seco. Segundo os autores a concentração encontrada neste tipo de vegetal foi elevada porque ele possui maior área superficial (Shen, Xia et al. 2013).

Os valores determinados no presente estudo variaram de 0,4 a $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para o DBP e 2,0 e $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ para o BBP, e estão dentro do limite estabelecido pela União Européia. Não há limites especificados para os alquilfenóis relacionados à migração.

6.4 Conclusão

Existe na literatura muitas evidências de alquilfenóis e plastificantes encontrados nos alimentos em diferentes faixas de concentração. Estes compostos são suspeitos de causarem danos ao sistema endócrino de homens e animais mesmo em baixas concentrações. Por isso torna-se importante o desenvolvimento de técnicas analíticas sensíveis que possam detectar e quantificar os alquilfenóis e plastificantes em baixas concentrações. Neste estudo, o método desenvolvido possibilitou a determinação destes compostos em baixas concentrações. O uso de SPME é vantajoso quando comparado à outras técnicas, pois permite a extração e concentração dos compostos sem o uso de solventes orgânicos. A técnica de GCxGC foi aplicada com sucesso na análise dos alquilfenóis e plastificantes obtendo-se uma boa resolução dos picos com consequente diminuição de interferências além da alta sensibilidade. Os vegetais são alimentos consumidos cotidianamente pelas pessoas e a presença de alquilfenóis e plastificantes nestes alimentos pode indicar uma fonte importante de exposição. Nas análises realizadas foi evidenciado que as concentrações dos plastificantes encontradas nas amostras de vegetais estão abaixo do limite específico de migração estabelecido pela legislação brasileira e europeia.

CAPÍTULO 7: DETERMINAÇÃO DE METABÓLITOS DE PLASTIFICANTES E BISFENOL A EM MULHERES COM ENDOMETRIOSE

7.1 Aspectos Gerais

Os ftalatos e BPA são suspeitos de causarem alterações no sistema endócrino do ser humano e por isso torna-se necessário a monitorização biológica para avaliar a exposição a estes compostos. A avaliação da exposição pode ser realizada por meio dos biomarcadores que são os metabólitos dos ftalatos e BPA presentes na urina. (IPCS 1993; Amorim 2003). O uso dos biomarcadores permite a detecção precoce de uma exposição aos ftalatos e BPA e possibilita estabelecer a associação com alterações do sistema endócrino e/ou surgimento de doenças. Uma das doenças, suspeita de estar relacionada com a elevada concentração destes compostos no organismo, é a endometriose (Reddy, Rozati et al. 2006; Kim, Chun et al. 2011). A endometriose é caracterizada pela proliferação do tecido endometrial para fora da cavidade uterina (Wu, Hu et al. 2014). Tendo em vista a importância da associação entre essa doença e a presença de ftalatos e BPA no organismo, este estudo descreve o desenvolvimento de um novo método para análise dos metabólitos de ftalatos e BPA em urina utilizando LPME e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. A LPME foi escolhida como técnica de extração, visto que a não foi possível a análise por SPME devido à etapa de derivatização. O derivatizante utilizado deteriorou a fibra de SPME utilizada. O método foi aplicado para determinação de monometilftalato (MMP), monoisobutilftalato (MiBP), monobutilftalato (MBP), monociclohexilftalato (MCHP), mono(etilhexil)ftalato (MEHP), monoisonilftalato (MiNP), monoetilftalato (MOP), monobenzilftalato (MBzP) e bisfenol A (BPA) em urina de mulheres com endometriose e mulheres com ausência da doença. A análise comparativa da presença dos metabólitos na urina das mulheres dos dois grupos foi realizada para avaliar a exposição a estes compostos e a relação entre a exposição aos metabólitos de ftalatos e BPA e a endometriose. O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG.

7.2 Materiais e Métodos

7.2.1 Reagentes

Os padrões de MBP e MEHP foram comprados da Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Alemanha). O padrão de MBzP foi adquirido da Cambridge Isotope

Laboratories (Andover, USA). Os padrões de MiNP, MOP, MMP, MCHP e MiBP foram adquiridos da AccuStandard (New Haven, USA). Uma solução estoque de 1000,0 mg L⁻¹ foi preparada em acetonitrila grau HPLC (J.T. Baker - Xalostoc, Edo. De Mex, México) para cada um dos compostos.

7.2.2 Otimização da Metodologia

- Escolha do solvente de Extração

O método de microextração em fase líquida foi escolhido para extração e concentração dos compostos. O método consiste na introdução de um solvente em uma fibra oca, posteriormente introduzida em um frasco contendo a amostra. O solvente utilizado na extração é denominado fase acceptora. Duas fases acceptoras foram avaliadas para extração dos compostos: o octanol e o decanoato de etila. Para tal, uma fibra oca de 10 cm foi embebida em octanol por 10 s e o excesso foi retirado por meio da introdução da fibra em um frasco contendo água, o qual foi sonicado por 5 s. A fibra foi preenchida com 35,0 µL de octanol e posteriormente foi introduzida em um frasco contendo 16,0 mL de uma solução aquosa de concentração igual a 1,0 mg L⁻¹. O frasco foi agitado, através da introdução de uma barra magnética de teflon, por 60 min em temperatura ambiente. O mesmo procedimento foi repetido utilizando decanoato de etila como solvente.

- Planejamento fatorial para otimização da extração

As condições de extração e dos parâmetros da derivatização foram otimizados por meio de um planejamento fatorial completo 2³ com ponto central. Para tal, uma solução aquosa dos compostos estudados na concentração de 500,0 µg L⁻¹ foi utilizada. As variáveis tempo, agitação e adição de sal, para avaliar o efeito *salt in out*, foram avaliadas para a extração dos compostos e para a derivatização avaliou-se o tempo, temperatura (medida no bloco de aquecimento) e quantidade de derivatizante. A interação entre estas variáveis também foi avaliada. As condições para cada teste são mostradas na Tabela 7.1 e Tabela 7.2

Tabela 7. 1: Planejamento fatorial completo 2^3 para otimização da extração

Experimento	Tempo (min)	Agitação (rpm)	Porcentagem de sal (m/v)
E1	40	100	0
E2	70	100	0
E3	40	700	0
E4	70	700	0
E5	40	100	10
E6	70	100	10
E7	40	700	10
E8	70	700	10
E9	55	400	5
E10	55	400	5
E11	55	400	5
E12	55	400	5

Tabela 7. 2: Planejamento fatorial completo 2^3 para otimização da derivatização

Experimento	Tempo (min)	Quantidade de derivatizante (μL)	Temperatura
D1	5	25	25
D2	25	25	25
D3	5	35	25
D4	25	35	25
D5	5	25	50
D6	25	25	50
D7	5	35	50
D8	25	35	50
D9	15	30	37,5
D10	15	30	37,5
D11	15	30	37,5
D12	15	30	37,5

7.2.3 Amostras

Foram coletadas amostras de urina de mulheres, com idade entre 18 e 45 anos, divididas em dois grupos: mulheres com endometriose (Grupo Estudo) e mulheres que não apresentavam o quadro clínico de endometriose (Grupo Controle). A coleta das amostras foi realizada no Hospital das Clínicas da UFMG em pacientes voluntárias para o estudo. As pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (anexo A) e preencheram um questionário (anexo B) para participação do estudo. O diagnóstico de

endometriose no Grupo Estudo e no Grupo Controle foi confirmado ou afastado pela cirurgia de videolaparoscopia com inspeção visual da pelve e biópsia de lesões suspeitas (diagnóstico histológico), realizado no ambulatório de endometriose do Hospital das Clínicas. Em três amostras o diagnóstico de endometriose foi confirmado pelo exame de ressonância.

7.2.4 Extração dos Analitos

A urina é uma matriz complexa e a análise dos metabólitos dos plastificantes e BPA requer um prévio tratamento para o processo de extração, tendo em vista os mesmos são eliminados na urina ligados à substratos endógenos (ácido glucurônico). Inicialmente, 16,0 mL da amostra foram transferidos para um frasco de 22 mL, no qual foi adicionado 200,0 μL de tampão acetato ($2,0 \text{ mol L}^{-1}$) e o pH foi ajustado 6,0-6,5 com uma solução de hidróxido de amônio (50 % V/V) ou ácido fosfórico ($6,0 \text{ mol L}^{-1}$). Após o ajuste de pH, 80,0 μL da enzima β -glucuronidase (*E. coli*) foi adicionada ao frasco contendo a amostra. A desconjugação enzimática foi feita em uma temperatura de 37 °C durante 90 min (Frederiksen, Jorgensen et al. 2010). Após o término do processo, o pH da amostra foi ajustado para 2 utilizando ácido fosfórico.

Para a extração dos analitos foi utilizada o método de microextração em fase líquida (LPME) com duas fases. O procedimento de extração consistiu de 35,0 μL de octanol introduzidos em uma fibra oca de 10 cm, previamente embebida em octanol por 10 s. A fibra oca contendo o octanol foi colocada dentro do frasco contendo 16,0 mL de amostra e uma barra magnética para a agitação por um período de 70 min em temperatura ambiente. Posteriormente, a fibra foi retirada do frasco de extração e o octanol contendo os analitos foi transferido para um frasco de 2,0 mL, contendo um insert, com o auxílio de uma seringa. Uma alíquota de 13,0 μL do octanol foi transferida para outro frasco de 2,0 mL, que continha 25,0 μL de BSTFA e 5,0 μL de acetonitrila. O frasco foi agitado por 30 s e em seguida, deixado em repouso por 5 min. Após o término da derivatização a amostra foi analisada por GC/MS.

7.2.5 Parâmetros de Mérito

Para a determinação dos parâmetros de mérito foi utilizado como matriz um *pool* de urina de mulheres com idade entre 18 e 45 anos, sem diagnóstico ou evidência de endometriose. As concentrações dos metabólitos nas amostras de urina foram determinadas

utilizando curvas de calibração em diferentes concentrações. Para construção das curvas foram feitas análises das concentrações em triplicatas independentes. O limite de detecção foi determinado pela injeção de dez brancos. Os valores de LOD foram obtidos através da aplicação da Equação 7.1 para MiNP, pois o metabólito não estava presente no branco. Para os demais metabólitos, cuja presença foi observada no branco a Equação 7.2 foi aplicada. Os valores obtidos nas equações foram substituídos na equação da reta para obtenção da concentração. O limite de quantificação foi determinado utilizando o menor ponto da curva de calibração. A precisão foi obtida através da análise de 10 replicatas do pool de urina com adição de padrão nas concentrações de 120,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o MiBP e MOP, 60,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o MMP e MBP, 20,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o MCHP, MEHP, MiNP, BPA e MBzP. A análise foi feita no mesmo dia.

$$\text{Área para cálculo do LOD} = \text{média} + (3 \times \text{desvio}) \quad \text{Equação 7.1}$$

$$\text{Área para cálculo do LOD} = (3 \times \text{desvio}) \quad \text{Equação 7.2}$$

7.2.6 Sistema Cromatográfico

As análises dos metabólitos de plastificantes e BPA foram realizadas em um cromatógrafo á gas (Agilent - 7890 C) acoplado a um espectrômetro de massas com analisador do tipo quadrupolo (Agilent - 5975 C). A análise cromatográfica foi feita com injeção no modo *splitless* por 2 min utilizando uma coluna 5% fenil polidimetilsiloxilana DB-5MS Agilent (60 m x 250 μm x 0,25 μm) com uma temperatura do injetor de 250 $^{\circ}\text{C}$ e fluxo de hélio de 1,5 mL min^{-1} . Foi feita uma rampa de temperatura com início em 120 $^{\circ}\text{C}$, com aumento para 220 $^{\circ}\text{C}$ a 5 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, mantida por 1 min, aumento para 270 $^{\circ}\text{C}$ a 3 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e aumento para 320 $^{\circ}\text{C}$ a 20 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, mantida por 5 min. O tempo total de corrida foi de 45,2 min. A análise foi realizada no modo SIM (*Selected Ion Monitoring*) com ionização por elétrons (EI) e energia de 70 eV. As razões massa/carga (m/z) monitoradas são apresentadas na Tabela 7.3.

Tabela 7. 3: Íons Monitorados no modo SIM na análise de metabólitos de ftalatos e BPA derivatizados

Composto	Íons
MMP	89, 163, 237
MiBP	223, 221, 41
MBP	223, 221, 41
MCHP	221, 223, 239
MEHP	223, 221, 239
MiNP	221, 223, 239
MOP	223, 221, 163
MBzP	91, 179, 163
BPA	357, 372, 207

7.3 Resultados e Discussões

O cromatograma obtido para a análise dos metabólitos de ftalatos e BPA derivatizados por GC/qMS no modo SIM é apresentado na Figura 7.1.

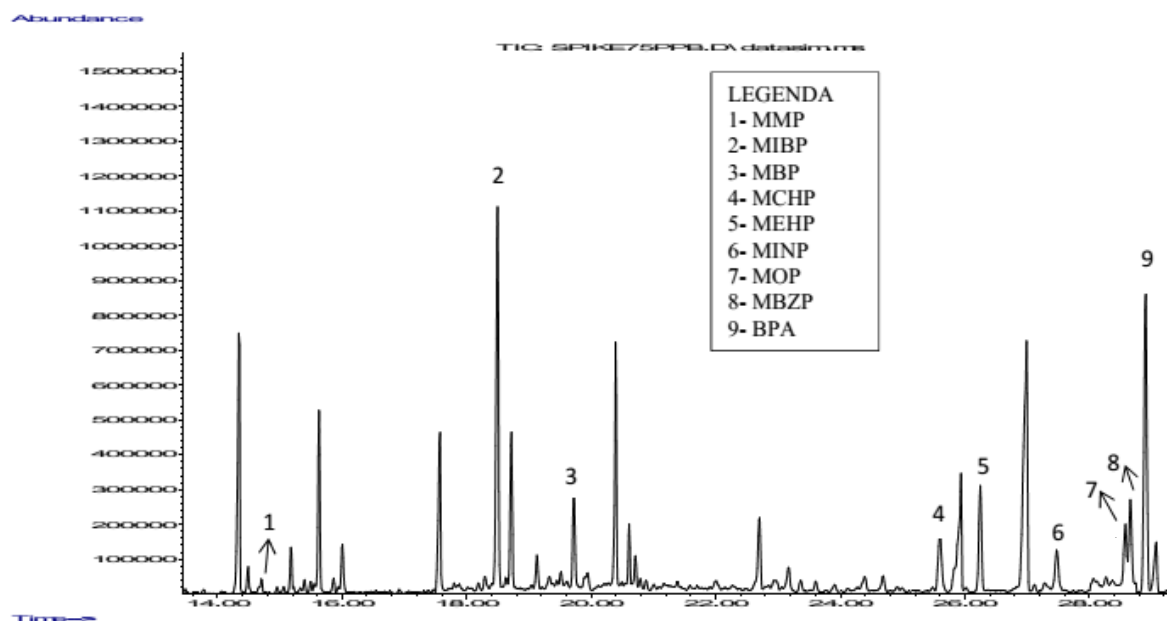


Figura 7. 1: Cromatograma de massas dos compostos estudados após derivatização por GC/qMS, modo SIM

7.3.1 Otimização da Metodologia

- Escolha do solvente de extração

Para comparação entre as fasesceptoras foi realizada a análise das áreas obtidas e os resultados são apresentados na Figura 7.2. O solvente octanol, quando utilizado no recobrimento e preenchimento da fibra oca, apresentou uma maior eficiência de extração para todos os compostos, e portanto, foi escolhido como solvente de extração.

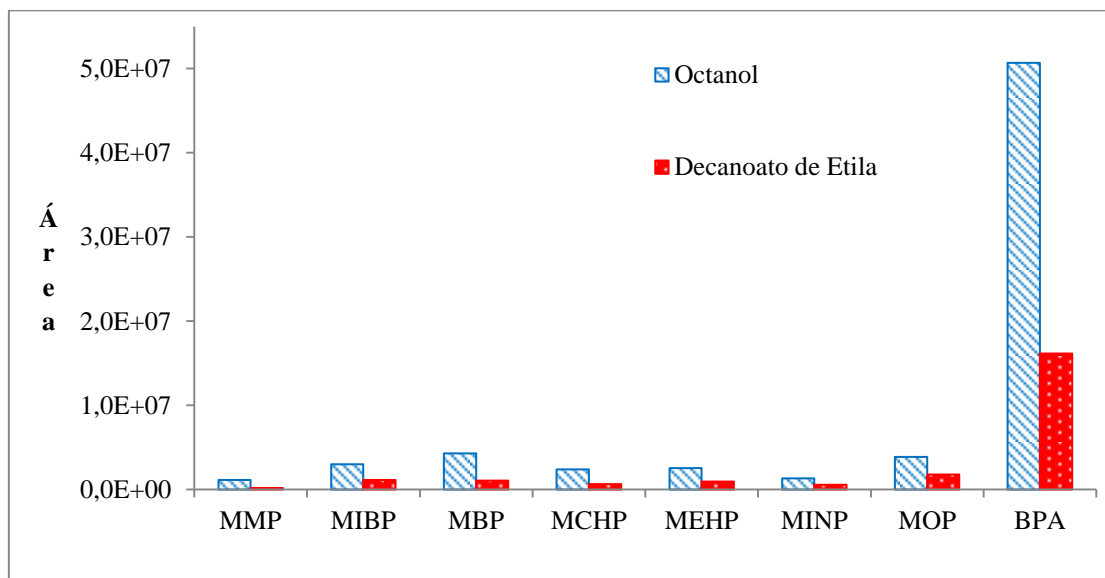


Figura 7. 2: Comparação dos solventes utilizados para extração dos metabólitos de plastificantes e BPA em urina

- Planejamento experimental para escolha das condições de extração

Para as análises dos resultados obtidos através dos experimentos feitos pelo planejamento fatorial utilizou-se o software Statistica. Os gráficos de Pareto obtidos são apresentados na Figura 7.3.



Figura 7. 3: Gráficos de Pareto obtidos no planejamento fatorial

A análise dos gráficos mostrou que as variáveis tempo de extração e agitação foram significativas, em um intervalo de 95 % de confiança, para todos os compostos estudados. O aumento do tempo e agitação favoreceram a extração dos compostos. Portanto, um tempo de 70 min e agitação de 700 rpm foram utilizados para extração dos compostos.

A variável adição de sal foi significativa, em um intervalo de 95 % de confiança, para os compostos estudados, exceto para os compostos BPA e MCHP. A adição de sal favoreceu a extração dos compostos MMP, MiBP e MBP. Para os demais compostos a adição de sal diminuiu a eficiência de extração. Além disso, foi observado posteriormente que em baixas concentrações a eficiência de extração é significativamente afetada e prejudica a quantificação de determinados metabólitos de plastificantes. Portanto, a adição de sal foi eliminada do método de extração,

- Planejamento experimental para determinação dos parâmetros da derivatização

Os resultados obtidos para o planejamento fatorial para a determinação das condições de derivatização foram avaliados através do software Statistica. Os resultados são apresentados na Figura 7.4.

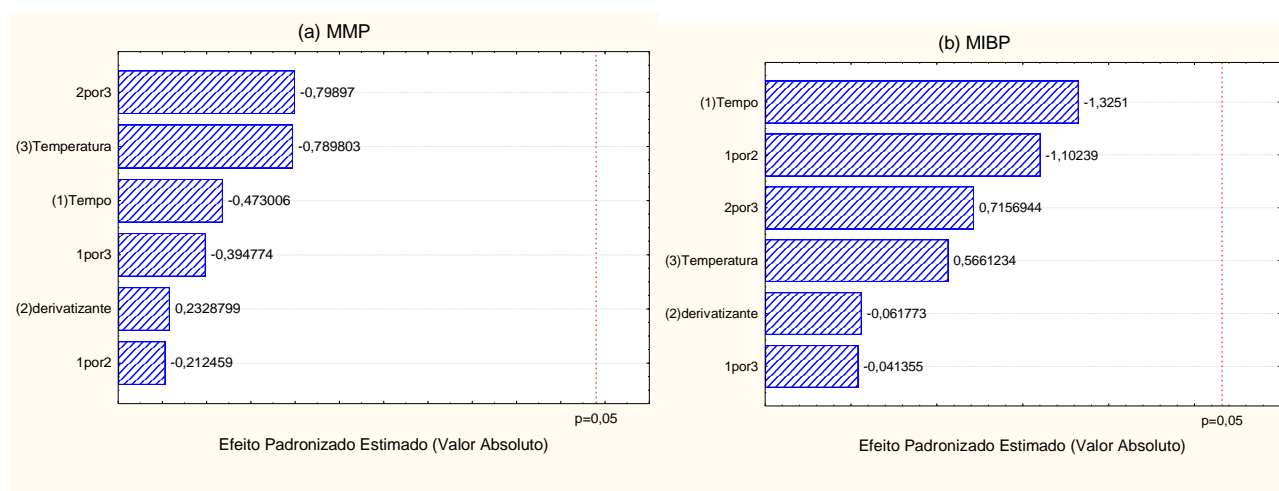


Figura 7. 3: Gráficos de Pareto obtidos no planejamento fatorial para otimização da derivatização



Figura 7.4 cont: Gráficos de Pareto obtidos no planejamento fatorial para otimização da derivatização

Os gráficos de Pareto obtidos para cada composto mostraram que nenhum dos parâmetros estudados foram significativos em um intervalo de 95 % de confiança dentro do domínio experimental avaliado. Portanto, a derivatização foi realizada na temperatura de 25 °C e tempo de 5 min. Outros estudos também reportam que alguns compostos reagem em segundos com BSTFA (Basheer, Parthiban et al. 2005) e um pequeno tempo de derivatização é necessário.

7.3.2 Parâmetros de Mérito

As curvas de calibração foram construídas em diferentes concentrações para os metabólitos. Os resultados referentes à faixa linear, equação de regressão, LOD, LOQ e precisão são apresentados na Tabela 7.4:

Tabela 7. 4: Resultados obtidos na avaliação dos parâmetros de mérito para os metabólitos de plastificantes e bisfenol A

Compound	Faixa Linear µg L ⁻¹	Equation	R ²	LOD µg L ⁻¹	LOQ µg L ⁻¹	Precisão - CV (%)	
						Intra	Inter
MMP	20 - 1000	y = 7900,5x + 12069	0,9953	18,8	20,0	12,0	15,9
MiBP	40 - 1000	y = 58117x - 16899	0,9886	31,1	40,0	16,0	18,6
MBP	20 - 500	y = 66698x + 370655	0,9961	6,5	20,0	12,8	17,9
MCHP	5 - 100	y = 84831x - 260516	0,9926	4,1	5,0	12,2	18,0
MEHP	10 - 200	y = 98403x - 404866	0,9867	7,8	10,0	12,6	19,5
MiNP	5 - 200	y = 34695x - 51604	0,9920	3,7	5,0	15,4	19,7
MOP	40 - 1000	y = 79339x - 722901	0,9904	11,3	40,0	15,7	18,6
MBzP	20 - 100	y = 66773x - 372719	0,9747	7,7	20,0	11,7	19,3
BPA	5 - 100	y = 327231x + 521643	0,9826	0,8	5,0	13,9	17,1

CV: coeficiente de variação

A linearidade da curva de calibração foi avaliada utilizando-se os seguintes testes estatísticos: normalidade de resíduos (Ryan-Joiner), independência dos resíduos (Durbin-Watson), homogeneidade dos resíduos (Brown-Forsythe), significância da regressão (ANOVA) e desvio da linearidade (ANOVA) (de Souza and Junqueira 2005). Os resultados dos testes estatísticos aplicados mostraram que os resíduos eram normais, homocedásticos e independentes para todos os compostos. A precisão foi determinada através da injeção de dez replicatas do pool de urina com adição de padrão dos compostos

estudados no mesmo dia. Os coeficientes de variação determinados apresentaram uma variação menor que 20 %. Os coeficientes de variação obtidos apresentaram valores semelhantes aos obtidos em outros estudos quando outras técnicas de extração são utilizadas. Em um estudo feito por Dewalque et al., no qual ftalatos foram determinados em amostras de urina, os coeficientes de variação variaram entre 18 e 20 % para MBP, MiBP, MBzP e MEHP quando SPE foi utilizada como técnica de extração (Dewalque, Pirard et al. 2014). Em outro estudo Frederiksen et al. obtiveram coeficientes de variação que variaram entre 3,9 e 21,7 % para análise de MBP, MiNP, MOP, MiBP, MBzP e MEHP em urina quando SPE foi utilizada para extração dos compostos (Frederiksen, Jorgensen et al. 2010)

7.3.3 Determinação da concentração dos metabólitos de plastificantes e bisfenol A em urina de mulheres

As concentrações de metabólitos dos plastificantes e BPA foram determinadas em dois grupos de mulheres: mulheres com endometriose (Grupo Estudo) e mulheres sem endometriose (Grupo Controle). Foram analisadas amostras de 20 mulheres do Grupo Estudo e 10 mulheres do Grupo Controle, cujos resultados são apresentados na Tabela 7.5. Os valores encontrados em $\mu\text{g L}^{-1}$ foram corrigidos pela quantificação da creatinina urinária.

Para comparação dos dois grupos é necessário considerar a variação diurética dos indivíduos. Para tal, a concentração de cada metabólito foi dividida pela concentração de creatinina em cada amostra de urina. As concentrações dos metabólitos com o ajuste pela creatinina são apresentadas na Tabela 7.5. A creatinina foi determinada por método colorimétrico utilizando um kit de dosagem de creatinina (Labtest).

Tabela 7. 5: Concentração dos metabólitos dos plastificantes e BPA em urina de mulheres do Grupo de Estudo e Grupo Controle, corrigidos pela creatinina urinário ($\mu\text{g g}^{-1}$ creatinina)

AMOSTRA	Grupo Estudo								
	MMP	MiBP	MBP	MCHP	MEHP ($\mu\text{g g}^{-1}$)	MiNP	MOP	MBzP	BPA
1E	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2E	-	79,1	-	6,5	10,0	-	-	-	4,5
3E	-	169,1	-	41,3	-	38,9	-	-	-
4E	-	69,7	-	-	-	-	-	-	-
5E	85,8	49,1	-	-	10,4	-	670,2	-	-
6E	21,5	424,9	137,5	2,7	6,0	9,8	-	-	-
7E	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8E	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9E	114,4	389,3	-	-	-	-	-	-	-
10E	-	446,7	-	-	-	-	-	-	-
11E	-	132,4	50,8	12,2	26,2	8,4	-	-	-
12E	-	-	191,8	-	79,7	-	-	-	-
13E	29,4	160,8	72,2	6,3	38,0	-	-	28,5	15,9
14E	-	115,0	53,4	10,9	55,9	21,2	-	-	-
15E	-	169,6	78,1	7,4	0,0	21,8	-	19,0	-
16E	-	160,6	56,3	-	17,8	137,6	-	-	-
17E	-	127,2	-	-	41,8	20,7	-	-	-
18E	-	-	-	-	-	249,0	-	-	-
19E	-	-	-	-	-	151,2	-	-	-
AMOSTRA	Grupo Controle								
	MMP	MiBP	MBP	MCHP	MEHP ($\mu\text{g g}^{-1}$)	MiNP	MOP	MBzP	BPA
1C	-	-	-	-	9,2	-	-	-	-
2C	45,3	310,0	72,4	3,9	40,6	34,7	-	-	8,8
3C	15,5	81,2	-	-	12,5	11,6	-	-	-
4C	-	110,8	-	-	26,9	14,5	-	-	-
5C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6C	255,4	68,2	114,6	-	-	-	-	-	-
7C	-	-	-	-	-	26,4	-	-	-
8C	-	218,1	41,9	12,1	-	-	-	-	-
9C	-	-	-	-	-	11,2	-	-	-
10C	-	-	-	-	-	-	-	-	-

As amostras de urina apresentaram concentrações variadas dos metabólitos estudados. Os metabólitos MMP, MiBP, MBP, MEHP e MiNP estavam presentes em muitas amostras de urina de mulheres do Grupo Estudo e do Grupo Controle. A Figura 7.5 mostra os gráficos de efeitos obtidos, bem como seus respectivos valores de P utilizando análise de variância (ANOVA).

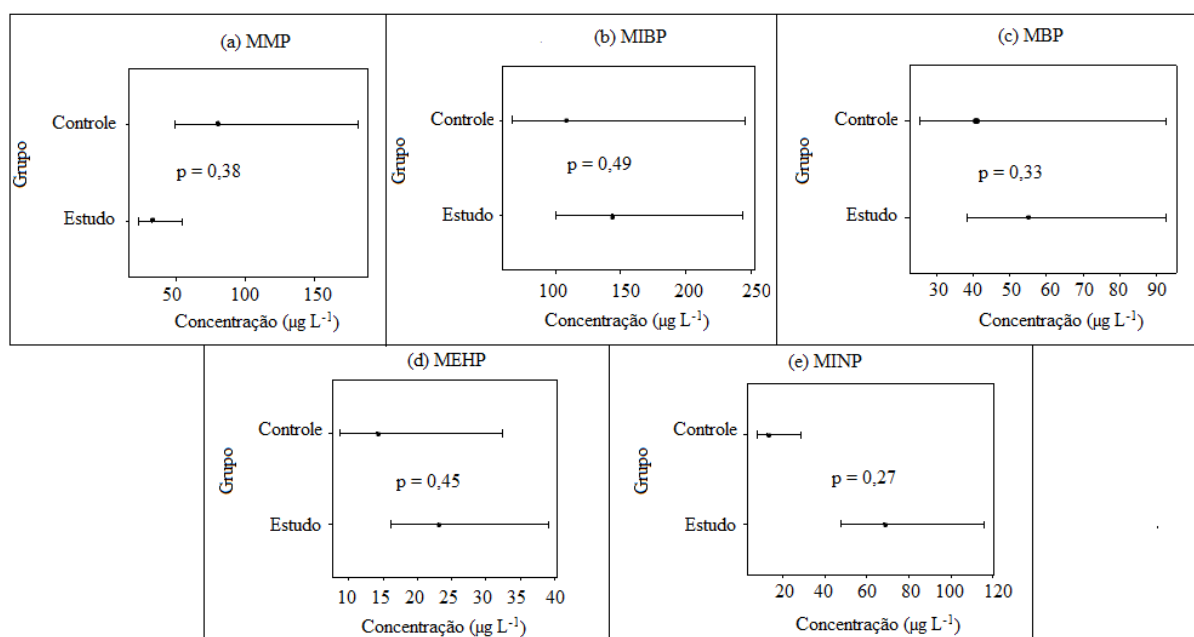


Figura 7. 4: Gráfico de efeito obtido na análise de variância dos compostos (a)MMP, (b) MiBP, (c) MBP, (d) MEHP e (e) MiNP

Através da análise da ANOVA foi observado que não houve diferença significativa, em um intervalo de confiança de 95 %, entre o Grupo Estudo e Grupo Controle para os compostos avaliados.

As concentrações medianas dos dois grupos foram avaliadas através do teste de *Wilcoxon rank sum* que mostrou que não há diferença significativa entre os dois grupos para nenhum dos metabólitos determinados, considerando-se um intervalo de 95 % de confiança.

Alguns estudos realizados anteriormente mostraram uma associação entre a endometriose e a concentração de metabólitos de ftalatos em amostras biológicas. Um estudo realizado por Reddy et al (2006) para determinação de ftalatos em amostras de plasma de mulheres indianas com endometriose mostrou uma correlação positiva entre os ftalatos e a presença de endometriose (Reddy, Rozati et al. 2006). Kim et al. (2011) mostraram uma relação entre a quantidade de DEHP e MEHP em amostras de plasma e a presença de endometriose em estágio avançado em mulheres coreanas (Kim, Chun et al. 2011). Um estudo realizado por Upson et al. mostrou uma associação entre endometriose a concentração de metabólitos de DEHP na urina de mulheres com diagnóstico da doença, contudo neste mesmo estudo os autores relataram que a associação entre endometriose e

outros metabólitos de ftalatos (MBzP e MEP) não foi significativa (Upson, Sathyanarayana et al. 2013). Outros estudos realizados também não mostraram uma relação entre ftalatos e a endometriose. Um estudo feito por Itoh et al., sobre análise de metabólitos de ftalatos em urina de mulheres japonesas com endometriose e em urina de um grupo controle mostrou que não houve associação entre metabólitos de plastificantes e endometriose (Itoh, Iwasaki et al. 2009).

7.4 Conclusões

Neste estudo foi desenvolvido um método para avaliação de oito metabólitos de plastificantes e BPA em amostras de urina. O método desenvolvido possui linearidade, precisão e limites de detecção e quantificação adequados para as análises propostas.

A endometriose é uma causa comum de infertilidade em mulheres e ainda possui etiologia pouco conhecida. A relação entre a endometriose e a concentração dos metabólitos de EDC foi avaliada por meio de um estudo caso-controle e os resultados obtidos não evidenciaram uma relação entre a concentração dos metabólitos e o quadro clínico de endometriose. Os metabólitos de ftalatos não foram encontrados em todas as amostras, portanto, análises de um número maior de mulheres seria necessário para reafirmar a relação positiva entre endometriose e os ftalatos.

CAPÍTULO 8 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo foram desenvolvidos métodos cromatográficos para análise de plastificantes, alquilfenóis e BPA em amostras de alimentos e de urina. Para cada método um estudo de otimização do preparo da amostra foi realizado. Os parâmetros de mérito também foram avaliados e os métodos mostraram-se adequados ao estudo proposto.

O método desenvolvido para avaliar a migração de plastificantes de recipientes plásticos para o alimento, utilizando água como simulante, permitiu avaliar a contaminação pelo uso de aquecimento de alimentos em recipientes plásticos em forno com radiação micro-ondas. O forno com radiação micro-ondas está presente em quase todos os lares e é comumente usado para aquecimento de alimentos dentro de recipientes plásticos. O estudo mostrou que a migração de plastificantes para alimento ocorre, principalmente, quando recipientes com prolongado tempo de uso são empregados no processo de aquecimento.

Outra possível fonte de contaminação alimentar por plastificantes e alquilfenóis estudada foram nos vegetais congelados armazenados em sacos plásticos, que são consumidos diariamente pela população. Neste estudo, o método desenvolvido permitiu a quantificação de plastificantes e alquilfenóis, em baixíssimas concentrações. O método GCxGC desenvolvido para a determinação de plastificantes e alquilfenóis em amostras de vegetais mostrou-se uma eficiente alternativa para a análise destes compostos, uma vez que o uso de GCxGC permitiu uma maior separação dos compostos diminuindo portanto, possíveis interferentes provindos da matriz.

Outra parte do trabalho foi o estudo da migração de plastificantes para alimentos assados, quando sacos plásticos que suportam altas temperaturas são utilizados no preparo de carne de frango. Novas tecnologias estão cada vez mais sendo introduzidas no cotidiano e avaliação do impacto que estas podem causar à saúde são necessárias. O método desenvolvido permitiu a quantificação de plastificantes em carnes de frangos que foram assados em sacos plásticos segundo as orientações de preparo recomendadas pelos fabricantes destes sacos. Não foi observada migração significativa dos plastificantes para as carnes analisadas, entretanto observou-se contaminação por plastificantes no tempero fornecido para o preparo da carne.

O estudo de plastificantes em alimentos apresentou algumas das diversas fontes de contaminação humana por plastificantes, contudo, para avaliar a exposição real e completa

aos plastificantes é necessário avaliar a presença destes compostos no organismo. Esta avaliação foi feita através da análise de metabólitos dos plastificantes e BPA em amostras de urina, utilizando-se um novo método de cromatografia gasosa com microextração em fase líquida. O método desenvolvido mostrou-se eficiente e permitiu a quantificação destes compostos em amostras de urina. Neste estudo uma relação entre a concentração de metabólitos de plastificantes e BPA nas amostras de urina de mulheres e a presença de endometriose foi avaliada. A comparação entre um grupo de mulheres com endometriose e um grupo controle foi realizada, observando-se que não houve diferença significativa nas concentrações dos metabólitos determinadas nas amostras de urina dos dois grupos quando estes são avaliados por testes estatísticos.

Os plastificantes e BPA são suspeitos de causarem diversos distúrbios no sistema endócrinos e o método desenvolvido foi aplicado na análise de plastificantes e BPA em urina de mulheres com endometriose, mas considerando-se a bom desempenho do método (linearidade, precisão e limite de quantificação) ele poderá futuramente ser utilizado para avaliar a relação destes compostos com outras doenças.

REFERÊNCIAS

- Amorim, L. C. A. (2003). "Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais." Revista Brasileira de Epidemiologia **6**: 158-170.
- Anderson, W. A. C., L. Castle, et al. (2001). "A biomarker approach to measuring human dietary exposure to certain phthalate diesters." Food Additives and Contaminants **18**(12): 1068-1074.
- Andre Amorim, L. C., J.-M. Dimandja, et al. (2009). "Analysis of hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons in urine using comprehensive two-dimensional gas chromatography with a flame ionization detector." Journal of Chromatography A **1216**(14): 2900-2904.
- Andrews, R. and S. Paterson (2012). "A validated method for the analysis of cannabinoids in post-mortem blood using liquid-liquid extraction and two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry." Forensic Science International **222**(1-3): 111-117.
- ANVISA (1996). Portaria nº 26/MS/SVS de 22 de março de 1996, Brasil.
- ANVISA. (2011). "RESOLUÇÃO - RDC Nº 41, DE 16 DE SETEMBRO DE 2011." from http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0041_16_09_2011.html.
- ATSDR (1995). "Agency for Toxic Substances and Disease Registry - TOXICOLOGICAL PROFILE FOR DIETHYL PHTHALATE."
- ATSDR (2001). "Agency for Toxic Substances and Disease Registry - TOXICOLOGICAL PROFILE FOR DI-n-BUTYL PHTHALATE."
- ATSDR (2002). "Agency for Toxic Substances and Disease Registry - TOXICOLOGICAL PROFILE FOR DI(2-ETHYLHEXYL)PHTHALATE."
- Aylward, L. L., S. M. Hays, et al. (2009). "Derivation of Biomonitoring Equivalents for di-n-butyl phthalate (DBP), benzylbutyl phthalate (BzBP), and diethyl phthalate (DEP)." Regulatory Toxicology and Pharmacology **55**(3): 259-267.
- Ballesteros-Gómez, A., S. Rubio, et al. (2009). "Analytical methods for the determination of bisphenol A in food." Journal of Chromatography A **1216**(3): 449-469.
- Basheer, C., A. Parthiban, et al. (2005). "Determination of alkylphenols and bisphenol-A - A comparative investigation of functional polymer-coated membrane microextraction and solid-phase microextraction techniques." Journal of Chromatography A **1087**(1-2): 274-282.
- Battle, R. and C. Nerín (2004). "Application of single-drop microextraction to the determination of dialkyl phthalate esters in food simulants." Journal of Chromatography A **1045**(1-2): 29-35.
- Blount, B. C., K. E. Milgram, et al. (2000). "Quantitative detection of eight phthalate metabolites in human urine using HPLC-APCI-MS/MS." Analytical Chemistry **72**(17): 4127-4134.

- Brasil (2008). "Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde, in Resolução Anvisa RDC nº 17 (2008) <http://www.aguaseguas.com.br/images/stories/pdflegislacaonovas/036.pdf> (accessed 18/11/2013)."
- Brix, R., S. Hvidt, et al. (2001). "Solubility of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates. On the possible role of micelles." *Chemosphere* **44**(4): 759-763.
- Bruckner, C. A., B. J. Prazen, et al. (1998). "Comprehensive two dimensional high-speed gas chromatography with chemometric analysis." *Analytical Chemistry* **70**(14): 2796-2804.
- Cacho, J. I., N. Campillo, et al. (2012). "Determination of alkylphenols and phthalate esters in vegetables and migration studies from their packages by means of stir bar sorptive extraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry." *Journal of Chromatography A* **1241**: 21-27.
- Casajuana, N. and S. Lacorte (2004). "New methodology for the determination of phthalate esters, bisphenol A, bisphenol A diglycidyl ether, and nonylphenol in commercial whole milk samples." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**(12): 3702-3707.
- Cavaliere, B., B. Macchione, et al. (2008). "Tandem mass spectrometry in food safety assessment: The determination of phthalates in olive oil." *Journal of Chromatography A* **1205**(1-2): 137-143.
- Chevrier, C., C. Petit, et al. (2012). "Maternal Urinary Phthalates and Phenols and Male Genital Anomalies (vol 23, pg 353, 2012)." *Epidemiology* **23**(4): 653-653.
- Cinelli, G., P. Avino, et al. (2014). "Study of XAD-2 adsorbent for the enrichment of trace levels of phthalate esters in hydroalcoholic food beverages and analysis by gas chromatography coupled with flame ionization and ion-trap mass spectrometry detectors." *Food Chemistry* **146**(0): 181-187.
- Cirillo, T., E. Fasano, et al. (2011). "Children's Exposure to Di(2-ethylhexyl)phthalate and Dibutylphthalate Plasticizers from School Meals." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**(19): 10532-10538.
- CITAC/EURACHEM (2002). "Cooperation on International Traceability in Analytical Chemistry/ EURACHEM Guide to Quality in Analytical Chemistry: An Aid to Accreditation (2002) http://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/CITAC_EURACHEM_GUIDE.pdf (accessed 07/09/2012)."
- CLS (1999). Committee on Hormonally Active Agents in the Environment, Board on Environmental Studies and Toxicology, Commission on Life Sciences, National Research Council - Hormonally active agents in the environment <http://www.nap.edu/catalog/6029.html>.
- COM (1999). Commission of the European Communities - Community strategy for endocrine disrupters: a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife. Communication from the commission to the council and the European parliament. Bruxelles.

- COM (2001). "Communication From The Commission to the Council and the European Parliament on the implementation of the Community Strategy for Endocrine Disrupters - a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife (COM (1999) 706)."
- Dallüge, J., J. Beens, et al. (2003). "Comprehensive two-dimensional gas chromatography: a powerful and versatile analytical tool." Journal of Chromatography A **1000**(1-2): 69-108.
- de Souza, S. V. C. and R. G. Junqueira (2005). "A procedure to assess linearity by ordinary least squares method." Analytica Chimica Acta **552**(1-2): 25-35.
- Del Carlo, M., A. Pepe, et al. (2008). "Determination of phthalate esters in wine using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry." Food Chemistry **111**(3): 771-777.
- Dewalque, L., C. Pirard, et al. (2014). "Simultaneous determination of some phthalate metabolites, parabens and benzophenone-3 in urine by ultra high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry." Journal of Chromatography B **949-950**(0): 37-47.
- Djokic, M. R., T. Dijkmans, et al. (2012). "Quantitative analysis of crude and stabilized bio-oils by comprehensive two-dimensional gas-chromatography." Journal of Chromatography A **1257**: 131-140.
- EC. (2012). "European Commission - disponível em http://ec.europa.eu/environment/endocrine/definitions/index_en.htm." Retrieved 17/03/2012, 2012.
- EFSA (2005). "Opinion of the scientific panel on food additives, flavouring, processing aids and material in contact with food on a request from the Commission related to bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) for use in food contact materials - European Food Safety Authority." EFSA Journal **243**: 1-20.
- EFSA (2005). "Opinion of the scientific panel on food additives, flavouring, processing aids and material in contact with food on a request from the Commission related to butylbenzyl phthalate (BBP) for use in food contact materials - European Food Safety Authority." EFSA Journal **241**: 1-14.
- EFSA (2005). "Opinion of the scientific panel on food additives, flavouring, processing aids and material in contact with food on a request from the Commission related to di-butyl phthalate (DBP) for use in food contact materials - European Food Safety Authority
- " EFSA Journal **242**: 1-17.
- Egestad, B., G. Green, et al. (1996). "Chromatographic fractionation and analysis by mass spectrometry of conjugated metabolites of bis(2-ethylhexyl)phthalate in urine." Journal of Chromatography B-Biomedical Applications **677**(1): 99-109.
- Erickson, B. E. (2008). "Bisphenol A under scrutiny." Chemical and Engineering News (American Chemical Society) **86**: 36-39.

- EU (2011). "European Union. Commission Regulation (EU) No 10/2011. Official Journal of the European Union (2011) <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:012:0001:0089:EN:PDF> (accessed 10/12/2013).".
- EURACHEM. (2002). "Guide to Quality in Analytical Chemistry, an AID to Accreditation."
- Fan, J. C., L. Wu, et al. (2012). "Determination of the migration of 20 phthalate esters in fatty food packaged with different materials by solid-phase extraction and UHPLC-MS/MS." *Anal. Methods* **4**(12): 4168-4175.
- Farajzadeh, M. A. and M. R. A. Mogaddam (2012). "Air-assisted liquid-liquid microextraction method as a novel microextraction technique; Application in extraction and preconcentration of phthalate esters in aqueous sample followed by gas chromatography-flame ionization detection." *Analytica Chimica Acta* **728**: 31-38.
- Feng, C. H. and S. R. Jiang (2012). "Micro-scale quantitation of ten phthalate esters in water samples and cosmetics using capillary liquid chromatography coupled to UV detection: effective strategies to reduce the production of organic waste." *Microchimica Acta* **177**(1-2): 167-175.
- Feng, Y. L., J. P. Zhu, et al. (2005). "Development of a headspace solid-phase microextraction method combined with gas chromatography mass spectrometry for the determination of phthalate esters in cow milk." *Analytica Chimica Acta* **538**(1-2): 41-48.
- Frederiksen, H., N. Jorgensen, et al. (2010). "Correlations Between Phthalate Metabolites in Urine, Serum, and Seminal Plasma from Young Danish Men Determined by Isotope Dilution Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry." *Journal of Analytical Toxicology* **34**(7): 400-410.
- Fredricsson, B., L. Moller, et al. (1993). "HUMAN SPERM MOTILITY IS AFFECTED BY PLASTICIZERS AND DIESEL PARTICLE EXTRACTS." *Pharmacology & Toxicology* **72**(2): 128-133.
- Fromme, H., T. Kuchler, et al. (2002). "Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment." *Water Research* **36**(6): 1429-1438.
- Ghiasvand, A. R., S. Hosseinzadeh, et al. (2006). "New cold-fiber headspace solid-phase microextraction device for quantitative extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment." *Journal of Chromatography A* **1124**(1-2): 35-42.
- Giudice, L. C. and L. C. Kao (2004). "Endometriosis." *The Lancet* **364**(9447): 1789-1799.
- Gonzalez-Castro, M. I., M. F. Olea-Serrano, et al. (2011). "Phthalates and Bisphenols Migration in Mexican Food Cans and Plastic Food Containers." *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **86**(6): 627-631.
- Guenther, K., V. Heinke, et al. (2002). "Endocrine disrupting nonylphenols are ubiquitous in food." *Environmental Science & Technology* **36**(8): 1676-1680.

- Guenther, K., E. Kleist, et al. (2006). "Estrogen-active nonylphenols from an isomer-specific viewpoint: a systematic numbering system and future trends." Analytical and Bioanalytical Chemistry **384**(2): 542-546.
- Hauser, R., J. D. Meeker, et al. (2007). "DNA damage in human sperm is related to urinary levels of phthalate monoester and oxidative metabolites." Human Reproduction **22**(3): 688-695.
- He, Y. H., M. H. Miao, et al. (2009). "Bisphenol A levels in blood and urine in a Chinese population and the personal factors affecting the levels." Environmental Research **109**(5): 629-633.
- Herbst, A. L., H. Ulfelder, et al. (1999). "Adenocarcinoma of the vagina. Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women (Reprinted from New England Journal of Medicine, vol 284, pg 878-81, 1971)." American Journal of Obstetrics and Gynecology **181**(6): 1574-1575.
- Holm, A., K. Solbu, et al. (2004). "Sensitive biomonitoring of phthalate metabolites in human urine using packed capillary column switching liquid chromatography coupled to electrospray ionization ion-trap mass spectrometry." Analytical and Bioanalytical Chemistry **378**(7): 1762-1768.
- Huang, L.-P., C.-C. Lee, et al. "The association between semen quality in workers and the concentration of di(2-ethylhexyl) phthalate in polyvinyl chloride pellet plant air." Fertility and Sterility **96**(1): 90-94.
- Ibrahim, N., R. Osman, et al. (2014). "Determination of Phthalate Plasticisers in Palm Oil Using Online Solid Phase Extraction-Liquid Chromatography (SPE-LC)." Journal of Chemistry.
- IPCS. (1993). "INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY - ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA 155 - Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles." from <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc155.htm>.
- IPCS/WHO. (2002). "International Programme on Chemical Safety - Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors." from http://www.who.int/ipcs/publications/new_issues/endocrine_disruptors/en/.
- Itoh, H., M. Iwasaki, et al. (2009). "Urinary phthalate monoesters and endometriosis in infertile Japanese women." Science of the Total Environment **408**(1): 37-42.
- Jen, J. F. and T. C. Liu (2006). "Determination of phthalate esters from food-contacted materials by on-line microdialysis and liquid chromatography." Journal of Chromatography A **1130**(1): 28-33.
- Jenkins, S., N. Raghuraman, et al. (2009). "Oral Exposure to Bisphenol A Increases Dimethylbenzanthracene-Induced Mammary Cancer in Rats." Environmental Health Perspectives **117**(6): 910-915.
- Kato, K., M. J. Silva, et al. (2005). "Determination of 16 phthalate metabolites in urine using automated sample preparation and on-line preconcentration/high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry." Analytical Chemistry **77**(9): 2985-2991.

- Kim, E. J., D. Lee, et al. (2014). "Association between urinary levels of bisphenol-A and estrogen metabolism in Korean adults." Science of the Total Environment **470–471**(0): 1401-1407.
- Kim, S. H., S. Chun, et al. (2011). "Increased plasma levels of phthalate esters in women with advanced-stage endometriosis: a prospective case-control study." Fertility and Sterility **95**(1): 357-359.
- Kim, Y. H., C. S. Kim, et al. (2003). "Gender differences in the levels of bisphenol A metabolites in urine." Biochemical and Biophysical Research Communications **312**(2): 441-448.
- Klosterhaus, S. L., R. Grace, et al. (2013). "Method validation and reconnaissance of pharmaceuticals, personal care products, and alkylphenols in surface waters, sediments, and mussels in an urban estuary." Environment International **54**: 92-99.
- Koch, H. M., L. M. Gonzalez-Reche, et al. (2003). "On-line clean-up by multidimensional liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry for high throughput quantification of primary and secondary phthalate metabolites in human urine." Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences **784**(1): 169-182.
- Kueseng, P., P. Thavarungkul, et al. (2007). "Trace phthalate and adipate esters contaminated in packaged food." Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes **42**(5): 569-576.
- Lintelmann, J., A. Katayama, et al. (2003). "Endocrine disruptors in the environment - (IUPAC Technical Report)." Pure and Applied Chemistry **75**(5): 631-681.
- Liu, P. Y., T. Tian, et al. (2013). "Assessment and analysis of phthalate esters, in Lake Pontchartrain, by SPME combining with GC-MS." Environmental Technology **34**(4): 453-462.
- Lomenick, J. P., A. M. Calafat, et al. (2010). "Phthalate Exposure and Precocious Puberty in Females." Journal of Pediatrics **156**(2): 221-225.
- Lopez-Darias, J., V. Pino, et al. (2010). "Utilization of a benzyl functionalized polymeric ionic liquid for the sensitive determination of polycyclic aromatic hydrocarbons, parabens and alkylphenols in waters using solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-flame ionization detection." Journal of Chromatography A **1217**(46): 7189-7197.
- Lu, J., J. Wu, et al. (2013). "Analysis of Bisphenol A, Nonylphenol, and Natural Estrogens in Vegetables and Fruits Using Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry." Journal of Agricultural and Food Chemistry **61**(1): 84-89.
- Maia Bila, D. and M. Dezotti (2007). "Endocrine disruptors in the environment: Part 1 - Effects and consequences." Quimica Nova **30**(3): 651-666.
- Marriott, P. and R. Shellie (2002). "Principles and applications of comprehensive two-dimensional gas chromatography." Trac-Trends in Analytical Chemistry **21**(9-10): 573-583.

- Meeker, J. D. and K. K. Ferguson (2011). "Relationship between Urinary Phthalate and Bisphenol A Concentrations and Serum Thyroid Measures in US Adults and Adolescents from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2007-2008." Environmental Health Perspectives **119**(10): 1396-1402.
- Menezes, H. C. and Z. d. L. Cardeal (2011). "Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons from ambient air particulate matter using a cold fiber solid phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry method." J Chromatogr A. **1218**(21): 3300-3305.
- Moffat, G. J., A. Burns, et al. (2001). "Glucuronidation of nonylphenol and octylphenol eliminates their ability to activate transcription via the estrogen receptor." Regulatory Toxicology and Pharmacology **34**(2): 182-187.
- Moreira, D. S., S. F. Aquino, et al. (2009). "Occurrence of endocrine disrupting compounds in water sources of Belo Horizonte Metropolitan Area, Brazil." Environmental Technology **30**(10): 1041-1049.
- Mousa, A., C. Basheer, et al. (2013). "Application of electro-enhanced solid-phase microextraction for determination of phthalate esters and bisphenol A in blood and seawater samples." Talanta **115**: 308-313.
- Murray, J. A. (2012). "Qualitative and quantitative approaches in comprehensive two-dimensional gas chromatography." Journal of Chromatography A **1261**: 58-68.
- Nagel, S. C., F. S. vomSaal, et al. (1997). "Relative binding affinity serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol." Environmental Health Perspectives **105**(1): 70-76.
- Nanni, N., K. Fiselier, et al. (2011). "Contamination of vegetable oils marketed in Italy by phthalic acid esters." Food Control **22**(2): 209-214.
- Nerin, C., C. Fernandez, et al. (2003). "Determination of potential migrants in polycarbonate containers used for microwave ovens by high-performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection." Journal of Agricultural and Food Chemistry **51**(19): 5647-5653.
- Nogueira, J. M. F. (2003). "Desreguladores Endócrinos: Efeitos adversos e estratégias para monitorização dos sistemas aquáticos." Química **88**: .65-71.
- Ohnishi, R., S. Yukimasa, et al. (2002). "Synthesis of elastomeric poly(propylene) (ELPP) using the highly active TiCl₄/dibutyl phthalate (DBP)/MgCl₂-Al(i-C₄H₉)(3)/1-allyl-3,4-dimethoxybenzene (ADMB) catalyst." Macromolecular Chemistry and Physics **203**(7): 1003-1010.
- Ostrovsky, I., R. Cabala, et al. (2011). "Determination of phthalate sum in fatty food by gas chromatography." Food Chemistry **124**(1): 392-395.
- Ozaki, A. and T. Baba (2003). "Alkylphenol and bisphenol A levels in rubber products." Food Additives and Contaminants **20**(1): 92-98.
- Pedroso, M. P., L. A. F. de Godoy, et al. (2009). "COMPREHENSIVE TWO-DIMENSIONAL GAS CHROMATOGRAPHY (GC x GC)." Quimica Nova **32**(2): 421-430.

- Prokupkova, G., K. Holadova, et al. (2002). "Development of a solid-phase microextraction method for the determination of phthalic acid esters in water." Analytica Chimica Acta **457**(2): 211-223.
- Quesnot, N., S. Bucher, et al. (2014). "Modulation of Metabolizing Enzymes by Bisphenol A in Human and Animal Models." Chemical Research in Toxicology **27**(9): 1463-1473.
- Rastkari, N. and R. Ahmadvani (2013). "Magnetic solid-phase extraction based on magnetic multi-walled carbon nanotubes for the determination of phthalate monoesters in urine samples." Journal of Chromatography A **1286**: 22-28.
- Reddy, B. S., R. Rozati, et al. (2006). "High plasma concentrations of polychlorinated biphenyls and phthalate esters in women with endometriosis: a prospective case control study." Fertility and Sterility **85**(3): 775-779.
- Romero-Franco, M., R. U. Hernandez-Ramirez, et al. "Personal care product use and urinary levels of phthalate metabolites in Mexican women." Environment International **37**(5): 867-871.
- Samandar, E., M. J. Silva, et al. (2009). "Temporal stability of eight phthalate metabolites and their glucuronide conjugates in human urine." Environmental Research **109**(5): 641-646.
- Schechter, A., M. Lorber, et al. (2013). "Phthalate Concentrations and Dietary Exposure from Food Purchased in New York State." Environmental Health Perspectives **121**(4): 473-479.
- Schroder, H. F. (2001). "Tracing of surfactants in the biological wastewater treatment process and the identification of their metabolites by flow injection-mass spectrometry and liquid chromatography-mass spectrometry and -tandem mass spectrometry." Journal of Chromatography A **926**(1): 127-150.
- She, Y., J. Wang, et al. (2012). "Determination of nonylphenol ethoxylate metabolites in vegetables and crops by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry." Food Chemistry **132**(1): 502-507.
- Shen, H.-Y. (2005). "Simultaneous screening and determination eight phthalates in plastic products for food use by sonication-assisted extraction/GC-MS methods." Talanta **66**(3): 734-739.
- Shen, L., B. Xia, et al. (2013). "Residues of persistent organic pollutants in frequently-consumed vegetables and assessment of human health risk based on consumption of vegetables in Huizhou, South China." Chemosphere **93**(10): 2254-2263.
- Silva, M. J., D. B. Barr, et al. (2003). "Glucuronidation patterns of common urinary and serum monoester phthalate metabolites." Archives of Toxicology **77**(10): 561-567.
- Song, N. R., J. W. On, et al. (2013). "Biomonitoring of urinary di(2-ethylhexyl) phthalate metabolites of mother and child pairs in South Korea." Environment International **54**: 65-73.

- UE, E. C. D. E.-. (2000). "Towards the establishment of a priority list of substances for further evaluation of their role in endocrine disruption." from http://ec.europa.eu/environment/archives/docum/pdf/bkh_main.pdf.
- UE, E. U.-. (2011). "COMMISSION DIRECTIVE 2011/8/EU of 28 January 2011 amending Directive 2002/72/EC as regards the restriction of use of Bisphenol A in plastic infant feeding bottles " Retrieved 11 julho, 2014, from <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:026:0011:0014:EN:PDF>.
- Upton, K., S. Sathyanarayana, et al. (2013). "Phthalates and risk of endometriosis." Environmental Research **126**: 91-97.
- USEPA (2001). U.S. Environmental Protection Agency. Report No.EPA/625/R-00/015, Washington DC. USA.
- Vallejo, A., M. Olivares, et al. (2011). "Optimization of comprehensive two dimensional gas chromatography-flame ionization detection-quadrupole mass spectrometry for the separation of octyl- and nonylphenol isomers." Journal of Chromatography A **1218**(20): 3064-3069.
- Vendeuvre, C., F. Bertoncini, et al. (2004). "Comparison of conventional gas chromatography and comprehensive two-dimensional gas chromatography for the detailed analysis of petrochemical samples." Journal of Chromatography A **1056**(1-2): 155-162.
- Villar-Navarro, M., M. Ramos-Payan, et al. (2013). "A novel application of three phase hollow fiber based liquid phase microextraction (HF-LPME) for the HPLC determination of two endocrine disrupting compounds (EDCs), n-octylphenol and n-nonylphenol, in environmental waters." Science of the Total Environment **443**: 1-6.
- Vokel, W., T. Colnot, et al. (2002). "Metabolism and kinetics of bisphenol A in humans at low doses following oral administration." Chemical Research in Toxicology **15**(10): 1281-1287.
- Vom Saal, F. S., P. S. Cooke, et al. (1998). "A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior." Toxicology and Industrial Health **14**(1-2): 239-260.
- von Muhlen, C., C. A. Zini, et al. (2007). "Nomenclature for comprehensive multidimensional chromatography in portuguese language." Quimica Nova **30**(3): 682-687.
- WHO (2002). "World Health Organization. International Programme on Chemical Safety (2002) http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/WHO_PCS_EDC_02.2.pdf (accessed 03/11/2012)."
- WHO/UNEP (2012). "World Health Organization - United Nations Environment Programme. State of the science of endocrine disrupting chemicals (2012) http://unep.org/pdf/9789241505031_eng.pdf (accessed 10/12/2013)."
- Wildbrett, G. (1973). "Diffusion of phthalic acid esters from PVC milk tubing." Environ Health Perspect **3**.

- Wittassek, M., H. M. Koch, et al. (2011). "Assessing exposure to phthalates - The human biomonitoring approach." Molecular Nutrition & Food Research **55**(1): 7-31.
- Wozniak, A. L., N. N. Bulayeva, et al. (2005). "Xenoestrogens at picomolar to nanomolar concentrations trigger membrane estrogen receptor-alpha-mediated Ca²⁺ fluxes and prolactin release in GH3/B6 pituitary tumor cells." Environmental Health Perspectives **113**(4): 431-439.
- Wu, D. B., M. Hu, et al. (2014). "Clinical efficacy of add-back therapy in treatment of endometriosis: a meta-analysis." Archives of Gynecology and Obstetrics **290**(3): 513-523.
- Wu, P. G., X. D. Pan, et al. (2014). "Determination of phthalate esters in non-alcoholic beverages by GC-MS and optimization of the extraction conditions." European Food Research and Technology **238**(4): 607-612.
- Wu, Y. P., Y. C. Wang, et al. (2012). "Rapid determination of alkylphenols in aqueous samples by in situ acetylation and microwave-assisted headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry." Journal of Separation Science **35**(16): 2122-2130.
- Xia, H. F., Y. Chi, et al. (2011). "Metabolomic evaluation of di-n-butyl phthalate-induced teratogenesis in mice." Metabolomics **7**(4): 559-571.
- Yilmaz, P. K., A. Ertas, et al. (2014). "Simultaneous determination of seven phthalic acid esters in beverages using ultrasound and vortex-assisted dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography." Journal of Separation Science **37**(16): 2111-2117.
- Zhang, P. J., L. Hu, et al. (2013). "Application of ionic liquids for liquid-liquid microextraction." Analytical Methods **5**(20): 5376-5385.
- Zhang, Z. Y. and J. Pawliszyn (1995). "QUANTITATIVE EXTRACTION USING AN INTERNALLY COOLED SOLID-PHASE MICROEXTRACTION DEVICE." Analytical Chemistry **67**(1): 34-43.

ANEXOS

Anexo A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

DETERMINAÇÃO DE DESREGULADORES ENDÓCRINOS NA URINA DE MULHERES COM ENDOMETRIOSE

Prezada Senhora,

Gostaria de convidá-la a participar de um estudo científico que tem o objetivo de gerar novos conhecimentos sobre a endometriose e outras doenças do ovário.

I. INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Esta pesquisa quer estudar novos testes para identificar alterações hormonais na urina de mulheres com endometriose para o diagnóstico da doença. Além disso, a pesquisa quer estudar material de biópsia (pequenos pedacinhos retirados da parte de dentro do útero, do peritônio- membrana que protege seus órgãos- e dos ovários) para identificar como a doença invade o organismo de umas mulheres mais do que de outras. Esse material de biópsia já seria retirado no momento da sua cirurgia, independente do estudo, sem nenhum risco adicional para a senhora. Durante a cirurgia, a senhora estará anestesiada e não terá desconforto algum. A endometriose pode acometer pessoas sem sintomas, e também pode ser confundida com outras doenças. Ainda não se sabe porque em algumas mulheres a doença é leve e em outras ela é tão grave. Sendo assim, estudaremos também pessoas saudáveis que pretendem fazer ligadura de trompas, assim como pessoas que serão operadas de cisto de ovário (de qualquer tipo) ou qualquer outra doença ginecológica benigna. Este material será submetido a exames para identificar substâncias possivelmente relacionadas ao efeito da endometriose e cistos ovarianos sobre os ovários. A coleta de material será realizada no Hospital das Clínicas da UFMG onde o mesmo será avaliado. Os resultados dos exames serão utilizados para o respectivo estudo, resguardado o sigilo do paciente. O material coletado será armazenado e, caso não utilizado em sua totalidade, será armazenado para estudos futuros. Caso isso aconteça, a senhora será contactada para autorizar seu uso.

II. SIGILO DOS DADOS

Todos os seus dados serão confidenciais, sua identidade não será revelada publicamente em hipótese alguma e somente os pesquisadores envolvidos neste projeto terão acesso a essas informações, que serão utilizadas somente para fins de pesquisa. Os dados obtidos serão utilizados para elaboração de artigos científicos, sendo garantida a confidencialidade da identidade dos pacientes participantes da pesquisa, sendo que material residual (não utilizado neste estudo) será mantido em arquivo e poderá ser utilizado para futuros projetos de pesquisa após sua autorização. Caso deseje, é possível pode optar pela destruição deste material residual.

III. BENÉFICIOS DA PESQUISA

Este estudo trará informações que poderão ajudar muitas mulheres no futuro. O conhecimento de algumas alterações hormonais associadas à endometriose poderá ajudar no desenvolvimento de novos métodos para

diagnosticar e acompanhar a doença. O estudo das biópsias poderá ajudar a entender como a doença invade o organismo e o que está envolvido na gravidade da doença, podendo, no futuro, auxiliar no desenvolvimento de novos medicamentos ou maneiras de se bloquear o avançar da doença.

IV. RISCOS

A coleta de urina será realizada no Ambulatório Jenny Faria do Hospital das Clínicas em frasco estéril, da mesma forma que se colhe o exame de urina rotina. Não há qualquer risco envolvido neste procedimento. Será necessário assepsia local com sabonete. Esta assepsia não está associada a desconforto.

V. RESSARCIMENTO DAS DESPESAS

Não está prevista qualquer forma de remuneração para as voluntárias, nem ressarcimento de despesas (não haverá ajuda de custo para as voluntárias *nem mesmo para deslocamento até o hospital*). Entretanto, as despesas específicas relacionadas com o estudo são de responsabilidade dos pesquisadores.

V. DEMAIS ESCLARECIMENTOS

Você tem total liberdade para esclarecer qualquer dúvida que possa surgir durante a pesquisa. Você poderá recusar-se a participar deste estudo e/ou abandoná-lo a qualquer momento, sem precisar se explicar. A aceitação ou não da participação neste estudo não influenciará no seu tratamento.

VI. TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____ voluntariamente, concordo em participar desta pesquisa no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Estou ciente do exposto acima e ainda de que esta pesquisa não trará qualquer prejuízo à minha saúde.

Belo Horizonte,.....de.....de.....

Assinatura da voluntária

Assinatura da pesquisadora

Pesquisadores: - Profa. Leliane Coelho André - Departamento de Análises Clínica e Toxicológica, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, Pampulha 6627 - Belo Horizonte/MG 31270901, Brasil Telefone: (31) 34096832. Email: leiliane@ufmg.br

- Profa Márcia Mendonça Carneiro – Av. Prof. Alfredo Balena, 190- Belo Horizonte - MG - Brasil - Cep 30130-100 Telefones:(31) 99573341/34099764. E-mail: marciamc@medicina.ufmg.br

COEP-UFMG: Av. Antonio Carlos, 6627- Unidade Administrativa II – 2º andar sala 2005 Cep:31270-901. Telefax:(31) 3409-4592 . email:coep@prpq.ufmg.br

Anexo B - Questionário

Determinação de Desreguladores Endócrinos na Urina de Mulheres com Endometriose

IDENTIFICAÇÃO DA PACIENTE

Nome: _____ Tel: _____ Cód

igo: _____ End: _____

Altura: _____ Peso: _____ Idade: _____

Profissão: _____

Formação escolar: 1º grau 2º grau completo 2º grau incompleto

3º grau completo 3º grau incompleto

Estado civil: solteira casada divorciada viúva

INFORMAÇÕES PESSOAIS

Tem exposição ocupacional com substâncias químicas? Sim Não

Você ingere bebida alcoólica? nunca 1-3 vezes/mês 1-2 vezes/semana

3-4 vezes/semana 5-6 vezes/semana todos os dias

Fuma? Sim Não

Se sim, qual a frequência: 1-2 cigarros/dia 5-10 cigarros/dia Mais de 10 cigarros/dia

Diagnóstico de endometriose: Sim Não Obs: _____

Existe algum caso de mulheres com endometriose na sua família?

Não Sim Se sim, qual grau de parentesco? _____

Com que idade você teve sua primeira menstruação? _____

Como foi seu período menstrual no último ano?

Regular Irregular Outro Descreva: _____

No último ano, qual foi a duração habitual do seu ciclo menstrual

Você faz uso de anticoncepcional oral? sim não Obs: _____

INFORMAÇÕES ADICIONAIS

Tem contato com praguicidas? sim não

Com quem frequência você come carne? nunca Diariamente

1-3 vezes/semana 4-6 vezes/semana

Com que frequência você ingere peixe? nunca 1-2 vezes/semana

3-4 vezes/semana 1 vez/mês

Com que frequência você ingere vegetais? nunca Diariamente 1 vez/mês

1-3 vezes/semana 4-6 vezes/semana

Com que frequência você ingere frutas? nunca Diariamente 1 vez/mês

1-3 vezes/semana 4-6 vezes/semana

Com que frequência você ingere alimentos preparados em micro-ondas? nunca

Diariamente 1 vez/mês 1-3 vezes/semana 4-6 vezes/semana