

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

**Gabriela Dias Cerqueira**

**Determinação de plastificantes e seus metabólitos em urina e saliva por  
HF-LPME-GC/MS para estudos de exposição odontológica**

**Belo Horizonte**

**2018**

**UFMG/ICEX/DQ.1259<sup>a</sup>**

**D.691<sup>a</sup>**

**Gabriela Dias Cerqueira**

**Determinação de plastificantes e seus metabólitos em urina e saliva por  
HF-LPME-GC/MS para estudos de exposição odontológica**

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

**Belo Horizonte**

**2018**

C416d Cerqueira, Gabriela Dias  
2018 Determinação de plastificantes e seus metabólitos  
D em urina e saliva por HF-LPME-GC-MS para estudos de  
exposição odontológica [manuscrito] / Gabriela Dias  
Cerqueira. 2018.  
[xvii], 81 f.v: il.

Orientador: Helvécio Costa Menezes.

Coorientadora: Zenilda de Lourdes Cardeal.

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

1. Química analítica - Teses 2. Cromatografia de  
gás - Teses 3. Urina - Análise - Teses 4. Saliva -  
Exame - Teses 5. Espectrometria de massa - Teses 6.  
Extração (Química) - Teses 7. Fenóis - Teses 8.  
Resinas dentárias - Teses 9. Boca - Câncer - teses I.  
Menezes, Helvécio Costa Menezes, Orientador II.  
Cardeal, Zenilda de Lourdes, Coorientadora III.  
Título.

CDU 043<sub>vvvv</sub>

**"Determinação de Plastificantes e seus Metabólitos em Urina e Saliva por HF-LPME-GC/MS para Estudos de Exposição Odontológica"**

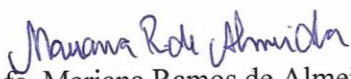
**Gabriela Dias Cerqueira**

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

  
Prof. Helvécio Costa Menezes - Orientador  
UFMG

  
Profa. Zenilda de Lourdes Cardeal - Coorientadora  
UFMG

  
Profa. Monica Yamauti  
UFMG

  
Profa. Mariana Ramos de Almeida  
UFMG

Belo Horizonte, 20 de fevereiro de 2018.

**“A persistência é o caminho do êxito.”**

**- Charles Chaplin -**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a Santo Expedito, pela oportunidade e por me dar força em todos os momentos da minha vida.

Agradeço à minha família pelo apoio e orações, em especial à minha mãe, minha avó e meu irmão que sempre estão ao meu lado.

Ao meu noivo pelo incentivo, companheirismo e paciência.

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

À Dra. Tarcília da Silva e à aluna doutoranda Tatiana Fernandes da Faculdade de Odontologia da UFMG pelas amostras concedidas.

Ao Cirurgião Dentista Alexandre Rocha pelas amostras concedidas.

Aos colegas da RMCA pela ótima convivência diária e pelo auxílio em alguns momentos, em especial a Lívia e Nayara.

À Rosi pela amizade, pelos conselhos e pelos ensinamentos.

À Larissa e à Ana Gabriela pela disponibilidade em me ajudar quando precisei.

A CAPES e ao Ministério da Saúde pelo auxílio financeiro.

À UFMG e ao Departamento de Química

## RESUMO

Neste trabalho, foi desenvolvido um método utilizando microextração em fase líquida com fibra oca para determinação do bisfenol A (BPA) e metabólitos de ftalatos: Monoisononil ftalato (MiNP), Monooctil ftalato (MOP), Monometil ftalato (MMP), Monociclohexyl ftalato (MCHP), Monoisobutil ftalato (MiBP), Monobutil ftalato (MBP), Monoetilhexyl ftalato (MEHP), Monobenzil ftalato (MBzP), Monoetil ftalato (MEP) e os ftalatos: Dimetil ftalato (DMP), Diisononil ftalato (DiNP), Dibutil ftalato (DBP), Dietil ftalato (DEP) em amostras reais de urina e saliva humana por cromatografia gasosa com detector de espectrometria de massas (GC/MS). Primeiramente, foram avaliados três solventes extratores: octanol, octanoato de etila e uma mistura destes na proporção (1:1, v/v) sendo que, a mistura foi selecionada como fase aceptora. O tempo de equilíbrio e a rotação do agitador usados na extração foram otimizados por meio de um planejamento Doehlert e, de acordo com a função desejabilidade, 55 min e 2000 rpm foram consideradas as condições ótimas para a extração. O método desenvolvido para as análises de urina apresentou bons resultados de seletividade, linearidade ( $R^2 > 0,913$ ), precisão ( $CV = 0,75 - 17,35 \%$ ), baixos limites de quantificação ( $0,36 - 21,03 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e detecção ( $0,11 - 6,03 \mu\text{g L}^{-1}$ ) para os analitos estudados. A recuperação variou entre 75 e 105 % e o fator de enriquecimento entre 421 e 569 %, comprovando que o método otimizado foi eficaz para pré-concentrar os analitos. O método desenvolvido foi aplicado em amostras reais de urina de voluntários que apresentavam carcinoma de células escamosas (CCE) de boca (Grupo Estudo) e voluntários que não apresentavam qualquer lesão bucal (Grupo Controle). Os analitos estudados foram encontrados em ambos os grupos em diferentes concentrações, sendo que o MMP foi encontrado em maiores concentrações no grupo estudo ( $322 - 2246 \mu\text{g g}^{-1}$ ). Uma análise de componentes principais foi realizada mostrando que nenhuma separação significativa ocorreu entre os dois grupos estudados. O método cromatográfico desenvolvido para as análises de saliva apresentou boa seletividade, linearidade ( $R^2 > 0,900$ ), baixos limites de detecção ( $0,03 - 0,53 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e de quantificação ( $0,09 - 1,78 \mu\text{g L}^{-1}$ ), boa precisão ( $CV = 0,86 - 18,68 \%$ ), ótima recuperação (83 - 120 %) e altos fatores de enriquecimento (502 - 719 %). O método proposto foi aplicado em dois tipos de estudo. No primeiro estudo, foram analisadas amostras de saliva de voluntários que apresentavam CCE (Grupo Estudo) e que não apresentavam CCE (Grupo Controle), todos os analitos foram encontrados em ambos os grupos, exceto o MBzP. Da mesma forma que na urina, MMP foi encontrado em maiores concentrações no grupo estudo ( $136 - 539 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e MEP foi encontrado em maiores concentrações no grupo controle ( $204 - 1351 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Uma análise de componentes principais nas amostras de saliva também foi realizada e observou-se uma tendência de separação ocorrendo na PC2, apesar da separação não ter sido completa, os resultados mostraram que os analitos MCHP, DBP, MBP, MMP e MEHP apresentaram influencia positiva nesta separação. O segundo estudo de aplicação para o método desenvolvido, avaliou a migração de plastificantes de resina composta (aplicada em tratamentos dentários) para a saliva de 8 pacientes. Para isso foi analisada a saliva do paciente antes de passar pelo procedimento e a saliva do paciente 15 min após a exposição ter ocorrido. Pode ser observado que as concentrações de todos os analitos aumentaram após a aplicação da resina, entretanto, estatisticamente não houve diferença significativa entre as concentrações (antes e depois do processo). Os resultados obtidos possibilitaram concluir que ambos os métodos desenvolvidos neste trabalho foram eficientes para a determinação de plastificantes em urina e saliva, tornando-os

adequados para serem aplicados em diversas formas de monitoramento das exposições humanas a esses componentes tóxicos.

**Palavras Chave:** cromatografia gasosa, HF-LPME, ftalatos, bisfenol A, fluidos biológicos



## ABSTRACT

A hollow fiber liquid phase microextraction method was developed for the determination of bisphenol A (BPA) and phthalate metabolites: Monoisobutyl phthalate (MiNP), Monoethyl phthalate (MEP), Monomethyl phthalate (MMP), Monocyclohexyl phthalate (MCHP), Monoisobutyl phthalate (MiBP) Monobutyl phthalate (MBP), Monoethyl phthalate (MEP), Monohexyl phthalate (MEHP), Monobenzyl phthalate (MBzP), Phthalates: Dimethyl phthalate (DMP), Diisobutyl phthalate (DiNP), Dibutyl phthalate (DBP) Diethyl phthalate (DEP) in real samples of urine and human saliva by gas chromatography with mass spectrometry detector (GC / MS). First, three extractive solvents were evaluated: octanol, ethyl octanoate and a mixture of these in the ratio (1: 1, v / v) where the mixture was selected as the acceptor phase. The equilibrium time and the rotation of the agitator used in the extraction were optimized by Doehlert planning and, according to the desirability function, 55 min and 2000 rpm were considered the optimum conditions for the extraction. The method developed for the urine analysis showed good results of selectivity, linearity ( $R^2 > 0.913$ ), precision ( $CV = 0.75 - 17.35 \%$ ), low limits of quantification ( $0.36 - 21.03 \mu\text{g L}^{-1}$ ) and detection ( $0.11 - 6.03 \mu\text{g L}^{-1}$ ) for the analytes. The recovery varied between 75 and 105% and the enrichment factor between 421 and 569 %, proving that the optimized method was effective to pre-concentrate the analytes. The method developed was applied in real urine samples from volunteers who had squamous cell carcinoma (SCC) of the mouth (Study Group) and volunteers who did not showed any oral lesion (Control Group). The analytes were found in both groups at different concentrations, and MMP was found at higher concentrations in the study group ( $322 - 2246 \mu\text{g g}^{-1}$ ). A principal component analysis was performed showing that no significant separation occurred between the two groups studied. The chromatographic method developed for saliva showed good selectivity, linearity ( $R^2 > 0.900$ ), low detection limits ( $0.03 - 0.53 \mu\text{g L}^{-1}$ ) and quantification ( $0.09 - 1.78 \mu\text{g L}^{-1}$ ), good accuracy ( $CV = 0.86 - 18.68 \%$ ) and recovery (83 - 120 %) and high enrichment factors (502 - 719 %). The proposed method was applied in two types of studies. In the first study, saliva samples of volunteers with CCE (Study Group) and without CCE (Control Group) were analyzed, all analytes were found in both groups except MBzP. As the same as in the urine, MMP was found in higher concentrations in the study group ( $136 - 539 \mu\text{g L}^{-1}$ ) and MEP was found in higher concentrations in the control group ( $204 - 1351 \mu\text{g L}^{-1}$ ). A principal component analysis in saliva samples was also performed and observed a tendency of separation occurring PC2, although the separation was not complete, the results showed that the MCHP, DBP, MBP, MMP e MEHP analytes showed a positive influence on this separation. The second application study for the developed method evaluated the migration of composite resin plasticizers (applied in dental treatments) to the saliva of 8 patients. For this, the saliva of the patient was analyzed before going through the procedure and the saliva of the patient 15 minutes after the exposure occurred. It can be observed that the concentrations of all the analytes increased after the application of the resin, however, statistically there was no significant difference between the concentrations (before and after the process). The results allowed to conclude that both methods developed in this work were efficient for the determination of plasticizers in urine and saliva, making them able to be applied in several ways of monitoring human exposures to these toxic components.

**Keywords:** gas chromatography, HF-LPME, phthalates, bisphenol A, biological fluids

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura geral dos ftalatos.....	7
Figura 2. Estrutura dos metabólitos de ftalatos (PEs) e metabólitos (MPEs).....	8
Figura 3. Rota metabólica dos ftalatos .....	11
Figura 4. Mecanismo de ação do MEHP no sistema endócrino .....	12
Figura 5. Estrutura do Bisfenol A.....	16
Figura 6. Biotransformação do bisfenol A: (1) Bisfenol A; (2) Bisfenol A-Glicuronato; (3) Bisfenol A-Sulfato .....	18
Figura 7. Mecanismo celulares e moleculares do BPA na indução de doenças crônicas em humanos.....	20
Figura 8. Resinas compostas derivados do BPA.....	22
Figura 9. Membrana de polipropileno usada na HF-LPME .....	27
Figura 10. Representação esquemática da microextração em fase líquida utilizando fibra oca com configuração A) em U; B) em haste.....	28
Figura 11. Modos de extração utilizados na microextração em fase líquida (HF-LPME): duas fases (A) e três fases (B) .....	29
Figura 12. Reação geral de formação do derivado silado.....	34
Figura 13. Esquema LPME .....	38
Figura 14. Resposta obtida para os analitos (1- MiNP, 2- MOP, 3- MMP, 4- MCHP, 5- MiBP, 6- MEP, 7- MBP, 8- MEHP, 9- MBzP) com diferentes solventes de extração ..	41
Figura 15. Superfície de resposta obtida pelo planejamento Doehlert .....	42
Figura 16. Cromatograma dos compostos estudados (1- MMP; 2-MEP; 3- MiBP ; 4- MBP ; 5- MCHP; 6- MEHP ;7-MiNP; 8-MOP; 9- MBzP; 10- BPA em urina após derivatização por GC/MS, modo Segment Scan .....	43
Figura 17. Relação entre 16 amostras e 16 controles pareados (sexo e idade), para cada um dos analitos estudados na urina .....	48
Figura 18. Gráfico de scores e loading para as duas classes estudadas: Grupo Estudo (Vermelho) e Grupo Controle (Verde) na urina .....	49
Figura 19. Cromatograma dos compostos estudados (1-DMP, 2-MMP,3- DEP, 4-MEP, 5-DiNP,6- MiBP, 7-MBP,8- DBP, 9-MCHP, 10-MEHP, 11-MiNP, 12-MBzP, 13-MOP, 14-BPA) em saliva após derivatização por GC/MS, modo SegmentScan .....	55
Figura 20. Relação entre 16 amostras e 16 controles pareados, para cada um dos analitos estudados na saliva .....	59
Figura 21. Gráfico de escores e loading para as duas classes estudadas :Grupo Estudo (vermelho) e Grupo Controle (verde) na saliva.....	60
Figura 22. Concentração média dos analitos estudados na urina em comparação com os mesmos compostos estudados na saliva .....	61
Figura 23. Gráfico de barras para 1-DMP; 2-MMP; 3-DEP; 4-MEP; 5-DiNP; 6-MiBP; 7-MBP; 8-DBP; 9-MCHP; 10- MEHP; 11- MiNP; 12-MOP; 13-MBzP; 14-BPA e box plot, correlacionando as concentrações dos analitos antes e depois do tramanto com resina.....	63
Figura 24. Extração dos analitos de uma resina composta em meio aquoso.....	64

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Os EDCs mais comuns usados no dia-a dia.....	5
Tabela 2. Propriedades físico-químicas dos compostos estudados.....	9
Tabela 3. Estudos recentes envolvendo a análise de PEs, metabólitos de PEs e BPA em fluidos biológicos .....	25
Tabela 4. Estudos recentes utilizando HF-LPME para extração e pré-concentração de diferentes analitos e matrizes.....	33
Tabela 5. Matriz experimental da extração dos EDCs com os valores codificados entre parênteses para o planejamento Doehlert .....	37
Tabela 6. Faixa linear, coeficiente de determinação, limites de detecção, limites de quantificação do método proposto para urina.....	44
Tabela 7. Precisão, recuperação e Fator de enriquecimento (F.E).....	45
Tabela 8. Concentração de metabólitos e do bisfenol A no grupo estudo e no grupo controle .....	466
Tabela 9. Faixa linear, coeficiente de determinação, limites de detecção, limites de quantificação do método proposto para saliva.....	56
Tabela 10. Cálculo de precisão intra e inter dias, recuperação e fator de enriquecimento para saliva.....	57
Tabela 11. Concentração dos metabólitos, ftalatos e o bisfenol A no grupo estudo e no grupo controle na saliva.....	58
Tabela 12. Média e desvio padrão das concentrações dos analitos encontrados na saliva antes e depois da aplicação da resina.....	62
Tabela 13. Teste T de Student para os analitos estudados presumindo variâncias diferentes.....	64

## LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AhR	Receptor de hidrocarbonetos de arila (Aryl Hydrocarboneto Receptor)
BBP	Benzilbutil ftalato
BBzP	Butilbenzil ftalato
Bis-DMA	Bisfenol A - Dimetacrilato
Bis-GMA	Bisfenol A - Glicidil Metacrilato
BSTFA	N,O-Bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide (N,Obis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide)
CCE	Carcinoma de células escamosas
CV	Coeficiente de variação
DBP	Dibutilftalato
DCHP	Dicicloexil ftalato
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DEHP	Di(etilexil) ftalato
DEHP	Dietilexil ftalato
DEP	Dietil ftalato
DiBP	Diisobutil ftalato
DIDP	Diisodecil ftalato
DiNP	Diisononil ftalato
DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva (Dispersive Liquid-Liquid Microextraction)
DMP	Dimetil ftalato
DnBP	Di-n-butil ftalato
DOP	Diocetil ftalato
DPHP	Dipropilheptil ftalato
EDC	Disruptor endócrino/ Desregulador endócrino
Efsa	Autoridade europeia para segurança alimentar (European Food Safety Authority)
EPA	Agencia de proteção ambiental dos estados unidos (Environmental Protection Agency)
ER	Receptor de estrogênios (Estrogenic Receptor)
EU	União Europeia (European Union)
FE	Fator de enriquecimento
GC	Cromatografia gasosa (Gas Chromatography)
GC/MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (Gas Chromatography-Mass Spectrometry)
HF-LPME	Microextração em fase líquida suportada com fibra oca (Hollow Fiber Liquid-Phase Microextraction)
HPA	Hidrocarboneto policíclico aromático
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (High Performance Liquid Chromatography)
IDA	Ingestão diária aceitável
LOD	Limite de detecção
LLE	Extração líquido-líquido ( Liquid Liquid Extraction)
LME	Limite de migração específica
LOQ	Limite de quantificação
MBP	Monobutil ftalato
MBzP	Monobelzil ftalato
MCHP	Monociclohexyl ftalato
MEHP	Monoetilexil ftalato

MEP	Monoetil ftalato
MiBP	Monoisobutil ftalato
MiNP	Monoisononil ftalato
MMP	Monometil ftalato
MMQP	Método dos mínimos quadrados ponderados
MOP	Monooctil ftalato
MPEs	Metabólitos de ftalatos (Phthalate metabolites)
PA	Ácido ftálico (Phthalic acid)
PC	Policarbonato
PCB	Bifenilpoliclorado
PEs	Ftalatos (Phthalate esters)
PPAR- $\alpha$	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha )
PVC	Policloreto de vinila
REACH	Registro, avaliação, autorização e restrição de substâncias químicas (Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals)
RMCA	Rede mineira de cromatografia avançada
SDME	Microextração em gota suspensa (Single Drop Microextraction)
SPE	Extração em fase sólida (Solid Phase Extraction)
SPME	Microextração em fase sólida (Solid Phase Microextration)
TMCS	(Trimetilsilil)
WHO	Organização mundial da saúde (World Health Organization)

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>v</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....</b>	<b>xii</b>
<b>Capítulo I- Introdução .....</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo II -Objetivos .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1- Objetivo Geral .....</b>	<b>3</b>
<b>2.2 - Objetivos específicos.....</b>	<b>3</b>
<b>Capítulo III - Revisão da Literatura.....</b>	<b>4</b>
<b>3 - Desreguladores Endócrinos.....</b>	<b>4</b>
<b>3.1- O sistema endócrino .....</b>	<b>6</b>
<b>3.2 - Ftalatos .....</b>	<b>7</b>
<b>3.2.1- Aspectos gerais dos plastificantes .....</b>	<b>7</b>
<b>3.2.2 - Formas de exposição .....</b>	<b>9</b>
<b>3.2.3 - Toxicocinética .....</b>	<b>10</b>
<b>3.2.3.1 - Absorção e distribuição .....</b>	<b>10</b>
<b>3.2.3.2 - Biotransformação e Excreção .....</b>	<b>10</b>
<b>3.2.4 - Tóxicodinâmica .....</b>	<b>11</b>
<b>3.2.4.1 - Mecanismos de ação .....</b>	<b>11</b>
<b>3.2.4.2 - Efeitos .....</b>	<b>13</b>
<b>3.2.5 - Aspectos Legais .....</b>	<b>14</b>
<b>3.3 - Bisfenol A .....</b>	<b>15</b>
<b>3.3.1 - Aspectos gerais .....</b>	<b>15</b>
<b>3.3.2 - Formas de exposição .....</b>	<b>16</b>
<b>3.3.3 - Toxicocinética.....</b>	<b>17</b>
<b>3.3.3.1 - Absorção e distribuição .....</b>	<b>17</b>
<b>3.3.3.2 - Biotransformação e Excreção .....</b>	<b>18</b>
<b>3.3.4 - Tóxicodinâmica .....</b>	<b>19</b>
<b>3.3.4.1 - Mecanismos de ação .....</b>	<b>19</b>
<b>3.3.4.2 - Efeitos .....</b>	<b>20</b>
<b>3.3.5 - Aspectos Legais .....</b>	<b>21</b>

3.4 - Disruptores endócrinos em materiais odontológicos.....	22
3.5 - Disruptores associados à carcinogénese .....	23
3.6 - Disruptores em amostras biológicas .....	24
3.7- Microextração em fase líquida –LPME.....	26
3.7.1- Recuperação e fator de enriquecimento .....	29
3.7.2 - Parâmetros que afetam a extração HF-LPME .....	31
3.7.2.1 - Solvente orgânico.....	31
3.7.2.2 - Tempo.....	31
3.7.2.3 - Temperatura .....	32
3.7.2.4 - Agitação.....	32
3.7.3 - Aplicações da HF-LPME.....	32
3.8 - Métodos cromatográficos para determinação dos ftalatos e seus metabólitos e o Bisfenol A .....	33
<b>CAPÍTULO IV- Determinação de Metabólitos de Ftalatos e Bisfenol A na urina</b>	<b>35</b>
4.1- Materias e Métodos .....	35
4.1.1- Materias e equipamentos.....	35
4.1.2 - Padrões e soluções .....	36
4.1.3 - Otimização das condições da extração .....	36
4.1.3.1 - Solvente extrator .....	36
4.1.3.2 - Planejamento Doehlert .....	36
4.1.4 - Preparo de amostra.....	37
4.1.5 - Método de extração HF-LPME .....	38
4.1.5.1- Membrana Porosa .....	38
4.1.5.2 - Extração otimizada dos analitos .....	38
4.1.6 - Derivatização .....	39
4.1.7- Análise Cromatográfica.....	39
4.1.7.1 - Instrumentação.....	39
4.1.7.2 - Aperfeiçoamento do sistema cromatográfico .....	39
4.1.8 - Parâmetros de Mérito.....	40
4.2 - Resultados e Discussões.....	40
4.2.1 - Otimização das condições da extração .....	40
4.2.1.1 - Solvente extrator .....	41
4.2.1.2 - Planejamento Doehlert .....	42
4.2.2 - Parâmetros de mérito .....	42
4.2.2.1 - Seletividade .....	42

4.2.2.2 - Faixa Linear, LD e LQ.....	43
4.2.2.3 - Precisão, Recuperação e Fator de enriquecimento .....	44
4.2.3 - Aplicação em amostras reais de urina .....	45
4.2.3.1 – Correlação entre amostras de pacientes com CCE e grupo controle .....	45
4.3 - Conclusões .....	50
<b>CAPÍTULO V- Determinação de Ftalatos, Metabólitos e Bisfenol A na saliva .....</b>	<b>51</b>
<b>5.1- Materias e Métodos .....</b>	<b>51</b>
5.1.1- Padrões e soluções .....	51
5.1.2 - Otimização das condições da extração .....	51
5.1.2.1 - Solvente extrator .....	51
5.1.2.2 - Planejamento Doehlert .....	52
5.1.3 - Preparo de amostra.....	52
5.1.4 - Método de extração HF-LPME .....	52
5.1.4.1 - Membrana Porosa .....	52
5.1.4.2 - Extração otimizada dos analitos .....	52
5.1.5 - Derivatização .....	53
5.1.6 - Análise Cromatográfica.....	53
5.1.6.1 - Instrumentação.....	53
5.1.6.2 - Sistema cromatográfico .....	53
5.1.6.3 - Parâmetros de Mérito .....	53
5.2 - Resultados e Discussões.....	54
5.2.1- Otimização das condições da extração .....	54
5.2.1.1 - Solvente extrator .....	54
5.2.1.2 - Planejamento Doehlert .....	54
5.2.2 - Parâmetros de mérito .....	54
5.2.2.1 - Seletividade .....	55
5.2.2.2 - Faixa Linear, LD, LQ .....	55
5.2.2.3 - Precisão, Recuperação e Fator de enriquecimento (F.E) .....	56
5.2.3 - Aplicação em amostras reais de saliva .....	57
5.2.3.1 - Correlação entre amostras de saliva de pacientes com carcinoma de células escamosas (CCE) e grupo controle .....	57
5.2.3.2 – Avaliação de migração de plastificantes para a saliva após tratamento com resina composta .....	61
5.3 - Conclusões .....	65



<b>Capítulo VI - Conclusões gerais .....</b>	<b>66</b>
<b>Capítulo VII - Referências .....</b>	<b>66</b>

## Capítulo I - Introdução

Nos últimos anos, a toxicidade de diversos poluentes ambientais tem sido investigada quanto a sua teratogenicidade e carcinogenicidade em seres humanos (FONTENELE et al., 2010). Este assunto tem gerado preocupação na comunidade científica devido a hipóteses de que a exposição a esses agentes químicos pode estar relacionada ao surgimento de diversas doenças (GOLOUBKOVA et al., 2000).

Há grande interesse científico em um grupo de substâncias químicas presentes no meio ambiente que podem interferir no sistema endócrino de humanos e outros animais e, com isso, afetar a saúde, o crescimento e a reprodução dos mesmos. Essas substâncias são conhecidas como desreguladores endócrinos (*Endocrine Disrupting Chemicals-EDCs*) (BILA et al., 2007).

O 2,2-bis (4-hidroxifenil) propano ou bisfenol A (BPA) e os ftalatos (PEs) são classificados como interferentes endócrinos e estão presentes em diversos produtos de uso doméstico, industrial e agrícola, e possuem comprovada atividade hormonal (FONTENELE et al., 2010).

O BPA é um monômero utilizado principalmente na produção de policarbonatos e resinas epóxi, para confecção de garrafas descartáveis, recipientes para armazenamento de alimentos, tubulações de água, retardador de chama, adesivos, revestimento interno de latas, material odontológico a base de Bis-GMA (Bisfenol Glicidil Metacrilato), como resinas de restaurações provisórias e compostas, tintas em pó, papel térmico, dentre outros. Estima-se que a produção mundial anual de BPA atualmente seja maior que cinco milhões de toneladas, destinadas a resinas de policarbonato (71%) e epóxi (27%) (LOPEZ et al., 2015). Os PEs são um grupo de compostos químicos derivados do ácido ftálico, utilizado como aditivo para deixar o plástico mais maleável. A produção mundial de ftalatos é da ordem de milhões de toneladas anuais, compondo diferentes produtos rotineiros como: produtos de higiene pessoal, cosméticos, tintas, tubos de PVC, embalagens de alimentos, adesivos, plásticos, brinquedos e borrachas escolares, resinas dentárias acrílicas, dentre outros (FONTENELE et al., 2010).

Os polímeros que possuem o BPA como monômero em sua cadeia podem sofrer hidrólise liberando o composto no ambiente. Os PEs por sua vez, não se ligam à matriz polimérica, logo esses materiais podem migrar ou evaporar para a atmosfera. Pesquisas indicam a presença destes compostos em diferentes meios, como esgotos, águas residuais,

leite materno e principalmente alimentos, especialmente os gordurosos BANEGAS et al., (2011); HEUDORF et al., (2007); TANAKA et al., (2002).

A análise de plastificantes em amostras biológicas pode ser realizada através da determinação de seus metabólitos em sangue, urina ou saliva. Estes atuam como biomarcadores e sua presença no organismo podem estar associadas ao surgimento de diversas doenças, possibilitando estabelecer umnexo-causal para as mesmas (FERNANDEZ et al., 2016).

Estudos recentes indicaram que a absorção do DOP (Dioctil ftalato) pode causar efeitos hepatotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos BANEGAS et al., (2011); HEUDORF et al., (2007); TANAKA et al., (2002). Vários trabalhos científicos relatam que exposições às baixas concentrações de BPA, durante o desenvolvimento do corpo humano, podem provocar proliferação de células de câncer no cérebro, na próstata e nas glândulas mamárias, além de perturbar a ação hormonal da tiróide e aumentar o risco de infertilidade BERNARDO et al., (2015); FASANO et al., (2012); MICHALOWICZ et al., (2014); ROCHESTER et al., (2013); TOMINAGA et al., (2006).

Devido à complexidade das matrizes biológicas a microextração em fase líquida suportada com fibra oca (*Hollow Fiber Liquid-Phase Microextraction-HF-LPME*) tem ganhado destaque para extração e pré-concentração desses analitos. Esta técnica é a miniaturização da extração líquido-líquido (*Liquid-Liquid Extraction- LLE*) convencional, logo utiliza micro litros de solvente orgânico em um único procedimento de extração, apresenta alta seletividade e altos fatores de recuperação. Na HF-LPME o solvente extrator (fase aceptora) é introduzido em uma fibra de polipropileno que entra em contato com a matriz aquosa (fase doadora) contendo os analitos. A força motriz do processo de LPME é a diferença de solubilidade do analito entre as fases aquosa e orgânica e, portanto, esse modo é geralmente empregado na extração de compostos com caráter neutro ou de baixa polaridade. Como o extrato obtido é orgânico ( 2 a 50 µL) a fase aceptora pode ser diretamente analisada por cromatografia gasosa (MAGALHÃES et al., 2009).

No presente trabalho, foi desenvolvido um método para determinação de PEs, seus metabólitos (MPEs) e BPA em amostras biológicas utilizando HF-LPME como técnica de extração e determinação por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (*Gas Chromatography Mass Spectrometry - GC/MS*). Foram realizados ensaios para otimização de alguns parâmetros que podem afetar a eficiência da extração, como o solvente extrator, tempo de extração e agitação. O método otimizado foi validado e aplicado para determinação de BPA, MPEs e PEs em amostras reais de saliva e urina.

## **Capítulo II - Objetivos**

### **2 - Objetivo Geral**

Desenvolver e aperfeiçoar um método HF-LPME-GC/MS para a determinação de bisfenol A, ftalatos e seus metabólitos em amostras de urina e saliva.

#### **2.1 - Objetivos específicos**

- Determinar as condições ótimas para extração dos analitos em urina por HF-LPME utilizando métodos de estatística multivariada.
- Validar o método HF-LPME-GC/MS desenvolvido para análise de ftalatos e metabólitos de ftalatos em amostras de urina.
- Determinar as condições ótimas para extração dos analitos em saliva por HF-LPME utilizando métodos de estatística multivariada.
- Validar o método HF-LPME-GC/MS desenvolvido para análise de ftalatos e metabólitos de ftalatos em amostras de saliva.
- Aplicar o método validado para determinação de ftalatos, metabólitos e BPA em amostras de saliva de pacientes que passaram por tratamento dentário utilizando resinas compostas.
- Aplicar o método validado para determinação de ftalatos, metabólitos de ftalatos e do BPA em amostras de saliva e urina de pacientes com diagnóstico comprovado de carcinoma de células escamosas de boca.

## Capítulo III - Revisão da Literatura

### 3 - Desreguladores Endócrinos

Um desregulador ou disruptor endócrino (*Endocrine Disrupting Chemicals- EDC*) é definido pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (*Environmental Protection Agency- EPA*) como um agente que interfere na síntese, transporte ou eliminação dos hormônios naturais do organismo (KABIR et al., 2015).

Os EDCs fazem parte de uma classe de compostos muito heterogênea e podem ser divididos em: hormônios naturais e artificiais; químicos industriais e produtos secundários do processo industrial e doméstico (KABIR et al., 2015).

A tabela 1 associa os EDCs mais comuns e sua utilização no dia-a-dia DODSON et al., (2012); GORE et al., (2014); KABIR et al., (2015).

Tabela 1. Os EDCs comuns usados no dia-a dia

<b>EDC's</b>	<b>Utilização</b>
Chumbo e cádmio	Produtos infantis
Bisfenol e fenol	Embalagens alimentícias
Retardante de chama,PCB's	Eletrônicos e materiais de construção
Ftalatos	Produtos de cuidado pessoal e instrumentos médicos, Produtos infantis, Embalagens alimentícias
Triclosan	Antibactericidas
Perfluoroquímicos	Vestuário e têxteis
Parabenos,éteres de glicol,fragrâncias,ciclosiloxanos	Cosméticos e produtos de cuidado pessoal e de limpeza
Tributil-estanho (TBT)	Anti-incrustantes, usado para pintar o fundo de navios e barcos
Nonilfenol (alquilfenol)	Sulfactantes, certos tipos de detergentes usados para remover óleo
Etinilestradiol (esteróide sintético)	Contraceptivos
DDT,atrazina,ácido diclorofenoxiacético	Pesticidas

Os EDCs podem ser expostos ao contato humano por diversas vias, como a simples ingestão de água ou comida, contato dérmico, inalação, rota intravenosa e pela transferência biológica através da placenta e leite materno (KABIR et al., 2015).

Nas últimas décadas existe um grande interesse a respeito do comportamento e efeito dos EDCs no organismo. Entretanto, para entender como ocorre essa disfunção, é preciso primeiramente conhecer o funcionamento normal do sistema endócrino (KABIR et al., 2015).

### 3.1- O sistema endócrino

O sistema endócrino é constituído por uma série de glândulas especializadas que segregam hormônios diretamente na corrente sanguínea como hipófise, tireóide e supra-renal (WHO et al., 2012).

Os hormônios são substâncias químicas (mensageiros) produzidas e secretadas pelas glândulas endócrinas e que, lançados na corrente sanguínea, coordenam o funcionamento do organismo como um todo. Algumas dessas funções são: controlar os níveis de sais, açúcares e lípidos no sangue, além do uso e armazenamento de energia no organismo. Os hormônios também controlam o crescimento e o desenvolvimento de um determinado organismo, sua reprodução e características sexuais (GHISELLI et al., 2007).

Os efeitos dos hormônios são mediados por proteínas específicas chamadas de receptores. Sem os receptores, os hormônios não podem exercer corretamente as suas funções (WHO et al., 2012).

Os disruptores endócrinos exibem as mesmas características que os hormônios e eles interferem em suas ações de diversas formas:

- i. Imitando a ocorrência natural dos hormônios no organismo como estrogênio, androgênio e hormônios da tireóide, produzindo uma superestimulação.
- ii. Agindo como antagonistas. Eles se ligam aos receptores dos hormônios endógenos assim, o hormônio natural não consegue se ligar ao receptor e nenhum sinal ocorre logo, o organismo não responde devidamente.
- iii. Interferindo ou bloqueando os hormônios naturais ou seus receptores HEINDEL et al., (2015); KABIR et al., (2015).

Essas interferências modificam os processos normais de sinalização em todo o corpo, o que pode levar a uma variedade de doenças do sistema endócrino, como diabetes, endometriose, desenvolvimento da tireóide, disfunções no sistema reprodutor feminino e masculino, dentre outras (HEINDEL et al., 2015).

O indício que certas substâncias poderiam causar disfunção no sistema endócrino de homens e animais surgiu no começo do século XX. Os primeiros relatos sobre o efeito desses produtos nos seres vivos foram feitos por CARSON et al., (1962) que analisou o impacto do

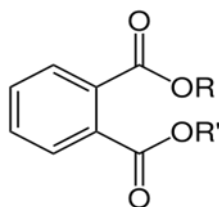
DDT (diclorodifeniltricloroetano) no meio ambiente e em animais. Outros problemas foram relatados entre 1948 e 1971 período em que mulheres utilizavam um contraceptivo abortivo que continha o hormônio dietilestilbestrol acusado de ser propenso ao desenvolvimento de câncer, e causar alteração no sistema reprodutor e imunológico (BIRKETT et al., 2002).

Apesar dos avanços que estão sendo feitos nos países desenvolvidos, as informações sobre este assunto ainda são bastante limitadas. Não há nenhuma avaliação documentada apropriada sobre a população exposta a disruptores endócrinos e o nível de toxicidade em que eles já estão (KABIR et al., 2015).

## 3.2 - Ftalatos

### 3.2.1 - Aspectos gerais dos plastificantes

Os Ftalatos (PEs) são compostos orgânicos derivados do ácido 1,2-benzeno dicarboxílico (HUANG et al., 2014). Sua estrutura consiste de um anel benzênico ligado a dois grupos ésteres. Como pode ser visto na figura 1 existem duas cadeias alifáticas e que dependendo da substituição podem gerar mais de 60 tipos de PEs com propriedades distintas.

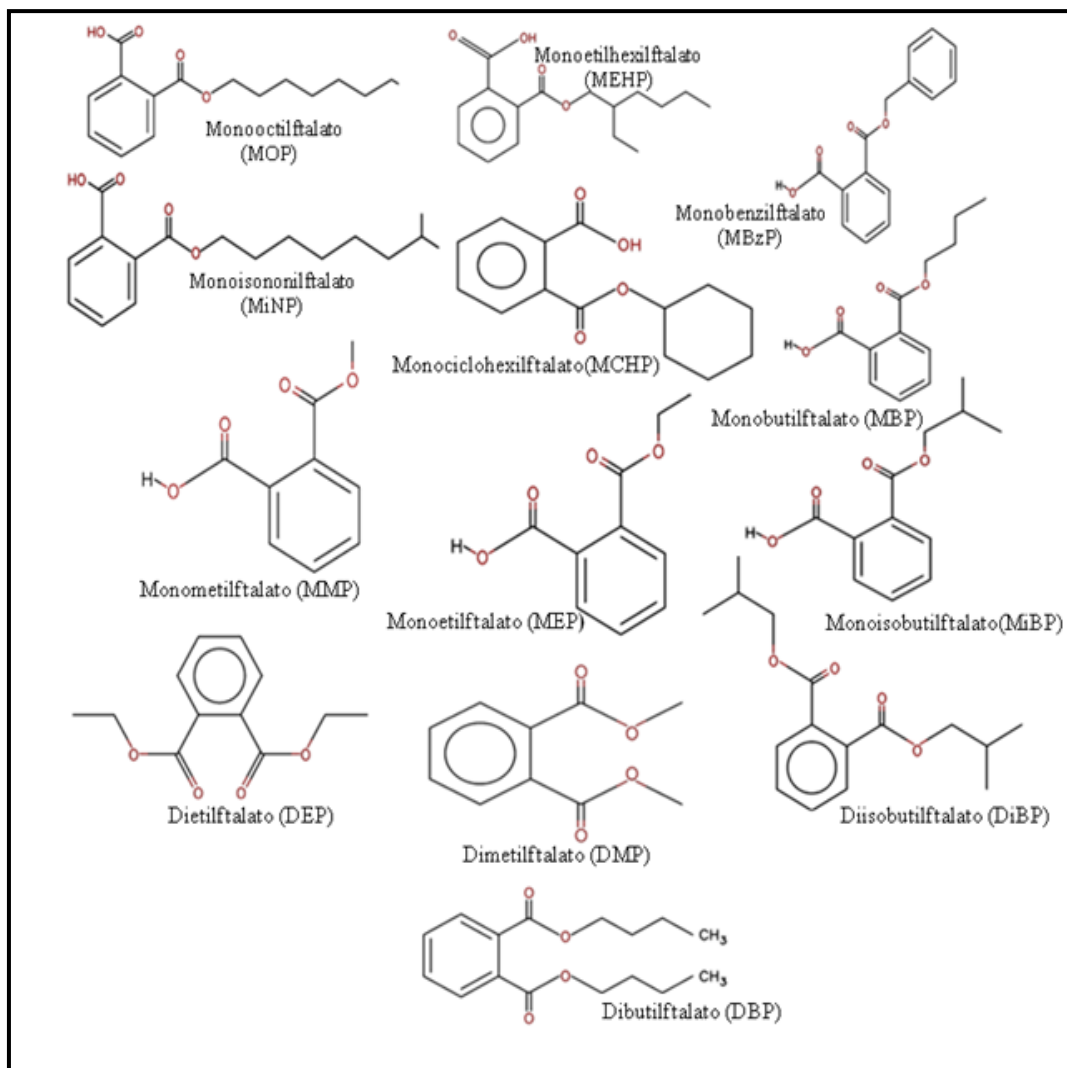


**Figura 1.** Estrutura geral dos ftalatos.

O PEs são líquidos incolores amplamente utilizados na indústria de PVC (Policloreto de Vinila) como aditivos que conferem flexibilidade à esse material (GAO et al., 2016). Esses compostos começaram a ser utilizados na indústria de plástico á mais de 80 anos. Os PEs são usados principalmente como plastificantes, mas também são empregados como agentes de estabilização e solubilizantes em outras aplicações como na fabricação de detergentes, produtos da construção civil (pisos vinílicos, revestimentos e filmes); óleos lubrificantes; na formulação de pesticidas; solventes; produtos de higiene pessoal (sabonetes, shampoos, perfumes; esmaltes de unha; dispositivos médicos (tubos e embalagens para armazenar sangue) e produtos infantis (mamadeira, brinquedos e chupetas) HERRERO et al., (2015); KIM et al., (2014).



A figura 2 apresenta as estrutura dos metabólitos de ftalatos (MPEs) e os PEs que serão estudados neste trabalho.



**Figura 2.** Estrutura dos metabólitos de ftalatos (PEs) e metabólitos (MPEs). Fonte: (Moreira et al., 2016)

A tabela 2 apresenta as principais características físico-químicas dos PEs, MPEs e do BPA.

Tabela 2. Propriedades físico-químicas dos compostos estudados.

Fonte: (Moreira et al., 2016)

Abreviação	Composto	Fórmula	CAS	Solubilidade em Água (mg L <sup>-1</sup> )	Log Kow	pka	Massa Molar g mol <sup>-1</sup>
<b>MiBP</b>	Monoisobutilftalato	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	5393-19-1	1.29	4.8	-	278.34
<b>MEP</b>	Monoetilftalato	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	30833-53-5	145.2	2.77	-	222.24
<b>MMP</b>	Monometilftalato	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	2528-16-7	51.7	3.22	4,2	256.25
<b>MBP</b>	Monobutilftalato	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	7517-36-4	18.95	3.64	-	248.27
<b>MCHP</b>	Monociclohexilftalato	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	2306-33-4	1212	1.86	3,26	194.18
<b>MEHP</b>	Monoetilhexilftalato	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	131-70-4	409	2.72	4,2	222.24
<b>MiNP</b>	Monoisononilftalato	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	4376-18-5	37121	1.13	3,18	180.16
<b>MOP</b>	Monooctilftalato	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>4</sub>	-	-	-	-	292.37
<b>MBzP</b>	Monobenzilftalato	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	4376-20-9	1,85	4.73	4,2	278
<b>DMP</b>	Dimetil ftalato	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	131-11-3	4000	1.6	-	194,19
<b>DEP</b>	Dietil ftalato	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	84-66-2	1000	2.47	-6.7	222,24
<b>DiBP</b>	Diisobutil ftalato	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	89-69-5	11,20	4.11	-6.7	278,34
<b>DBP</b>	Dibutil ftalato	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	84-74-2	200	4.5	-6.7	278,34
<b>BPA</b>	Bisfenol A	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	80-05-7	300	3,49	9,6	228

Os PEs são substâncias que apresentam baixa solubilidade em água, solubilidade elevada em compostos hidrofóbicos e baixa volatilidade.

### 3.2.2 - Formas de exposição

A exposição via oral, a inalação (ar contaminado por materiais de construção, inalação acidental de solo, pó doméstico, dispositivos médicos à base de PVC) bem como o contato dérmico com produtos que contém essas substâncias, são as principais fontes de exposição humana aos PEs (SCHETTLER et al., 2006). Porém, acredita-se que a forma de exposição mais relevante é a ingestão de alimentos (90%), pois estes podem absorver os compostos que migram de suas embalagens ou através do processo de produção (LOUREIRO et al., 2002).

Alguns estudos sugeriram ANDERSON et al., (2001); ROZATI et al., (2002) que o alimento representa a fonte mais importante de exposição ao Dimetil ftalato (DMP), Dietil ftalato (DEP), Dibutil ftalato (DBP), Benzilbutil ftalato (BBP) e do Dietilhexil ftalato (DEHP) HERRERO et al., (2015); UPSON et al., (2013).

Devido a incapacidade em se ligar quimicamente à matriz polimérica, alguns estudos reportaram a migração de PEs para o alimento. Um estudo feito por WU et al., (2014) mostrou que as concentrações de PEs em bebidas não alcoólicas variaram de 0,015 até 0,159 mg L<sup>-1</sup>.

OSTROVSKÝ et al.,(2011) observaram concentrações de PEs de 1,5 até 12,5  $\mu\text{g g}^{-1}$  em alimentos gordurosos. Em cosméticos, PEs foram determinados em concentrações que variaram de 0,41 a 38,34  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (FENG et al., 2012).

De acordo com CAO et al., (2010); ADDICTIVES et al., (2013); SHELBY et al., (2005) esses compostos podem migrar para a comida através de tubos tipicamente usados no processo de ordenha, através de filmes de embalagens, luvas utilizadas para preparação do alimento e correias transportadoras. Esses compostos também foram encontrados em tintas e adesivos de embalagens alimentícias assim como em revestimentos de utensílios de cozinha (SERRANO et al., 2014)

### **3.2.3 -Toxicocinética**

#### ***3.2.3.1- Absorção e distribuição***

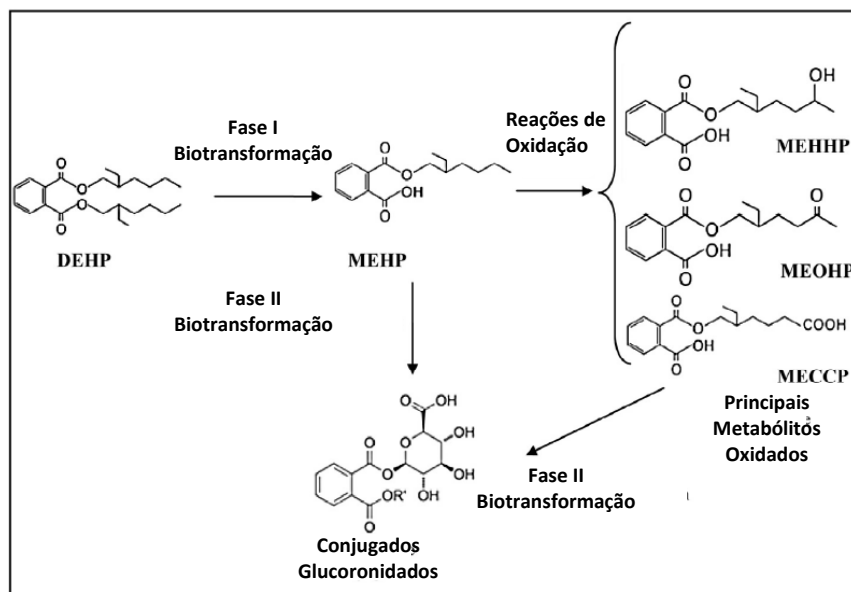
Devido a natureza lipofílica deste compostos, os tecidos dérmicos e pulmonares não constituem barreiras para absorção deste substâncias. A forma de absorção predominante ocorre na saliva ou no estomago após administração oral SILVA et al., (2007); WITTASSEK et al., (2008).

Em mamíferos o metabolismo dos PEs é rápido e sua distribuição ocorre uniformemente por todo organismo (SILVA et al., 2007).

#### ***3.2.3.2 - Biotransformação e Excreção***

Os PEs normalmente seguem uma via de biotransformação que ocorre em duas etapas. Na primeira, estes compostos com menor peso molecular são hidrolisados para monoésteres em uma biotransformação de fase I (Fig. 3) em um processo catalisado por lípases e esterases no intestino e parênquima. Os PEs com maior massa molar podem ser metabolizados para formar produtos oxidativos (álcoois, cetonas e ácidos carboxílicos). Na segunda etapa ambos os monoésteres hidrolizados e oxidativos podem reagir com o ácido glucorônico durante uma biotransformação de fase II (Fig. 3), antes da excreção através da urina ou fezes. A glucuronidação facilita a excreção e pode reduzir a biodisponibilidade dos metabolitos, minimizando a sua potencial atividade biológica. A concentração total de MPEs é

normalmente usada como biomarcadores de exposição à essas espécies RAMESH et al., (2016); SAMANDAR et al., (2009).



**Figura 3.** Rota metabólica dos ftalato. Fonte: Adaptado de (RAMESH et al., 2016)

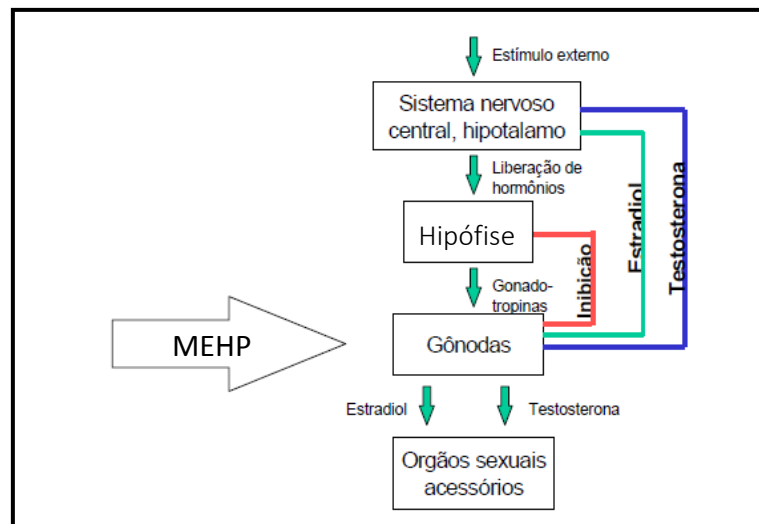
Os PEs relativamente polares e de cadeia curta (número de carbonos menor que oito) como DMP, DEP são rapidamente hidrolizados e possuem meia-vida de eliminação na sua forma livre glucoronidada entre 5 - 6h. Em contrapartida, os PEs de cadeia longa tais como DEHP (Dietilhexil ftalato), DiNP (Diisonil ftalato) apresentam um maior tempo de semi-vida de eliminação. Por exemplo, somente 2 - 7 % do DEHP é semi-eliminada em cerca de 12h do organismo humano (RAMESH et al., 2016).

### 3.2.4 -Tóxicodinâmica

#### 3.2.4.1- Mecanismos de ação

Os principais órgãos alvo dos PEs são o fígado, rins, tireóide e testículos. Em 1995, JOBLING et al. (1995) relataram a atividade estrogênica do DnBP (Di-n-butil ftalato) e do BBzP (Butilbenzil ftalato), indicando que estes PEs teriam forte afinidade por receptores estrógenos periféricos. Em outro estudo em células *in vitro*, foi considerado que o MEHP (Monoetilhexil ftalato) estava associado à inibição da glândula hipófise (Fig.4), responsável por várias funções no organismo (produção de corticóides naturais, óvulos e espermatozóides, dentre outros) (STAHLSCHMIDT-ALLNER et al., 1997).

O papel dos PEs na toxicidade do sistema endócrino resulta do fato de serem capazes de se ligar aos receptores da tireóide atuando como agonistas ou antagonistas. Acarretando no surgimento de diversas doenças associadas ao desenvolvimento neurológico e reprodutor (SVECHNIKOV et al., 2010)



**Figura 4.** Mecanismo de ação do MEHP no sistema endócrino. Fonte: adaptado de (LOUREIRO, 2002)

Os PEs também são considerados potenciais carcinogênicos e diversos estudos comprovaram o aparecimento de tumores em animais que foram expostos a doses diárias destes compostos RUSYN et al., (2012); WANG et al., (2012). Os PEs atuam na ativação de receptores como o receptor alfa ativado por proliferadores de peroxissoma (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha-PPAR- $\alpha$* ) este estímulo acarreta na proliferação de peroxissomas; no aumento do stress oxidativo das células; na indução da proliferação celular provocando lesões no DNA e no desenvolvimento de carcinomas (RUSYN et al., 2006)

Os PPARs funcionam como fatores de transcrição e moduladores da expressão gênica. Essas ações permitem aos PPARs regularem uma variedade de processos biológicos e desempenham um papel significativo em várias doenças. Os PEs são conhecidos como proliferadores de peroxissoma hepatocarcinogênicos em roedores e a ativação do PPAR $\alpha$  foi proposto como mecanismo para a hepatocarcinogênese (WANG et al., 2012).

Em humanos, ainda não é possível correlacionar a proliferação do PPAR $\alpha$  com a exposição ao DEHP, esta associação não é feita, pois existem níveis menores de PPAR em humanos, tornando-os menos sensíveis à ativação deste receptor (LAPINSKAS et al., 2005)

Assim, alguns estudos sugerem que o receptor de hidrocarbonetos de arila (*Aryl Hydrocarboneto Receptor- AhR*) desempenha um importante papel na carcinogênese induzida

pelos ftalatos em humanos, sendo que a sua função é influenciada de acordo com a dose dos mesmos. Evidências experimentais indicam que AhR tem um importante papel na proliferação celular, diferenciação e homeostase do sistema imunológico e hepático, bem como no desenvolvimento de tumores (WANG et al., 2012)

Os mecanismos de ação dos ftalatos são complexos e ainda pouco conhecidos, o que se sabe é que a influência no surgimento de diversas doenças está associada principalmente à dose e à duração da exposição.

#### **3.2.4.2 - Efeitos**

Tem sido associada a presença dos PEs a efeitos adversos para a saúde de homens e animais (SERRANO et al., 2014). Muitos testes foram realizados em animais quanto à toxicidade dos PEs. Experimentos com ratos de laboratório mostraram que a exposição à ftalatos aumenta a chance de aborto espontâneo, deformidades, lesão testicular, lesão hepática, câncer de fígado e ganho de peso HEINDEL et al., (2015); KIM et al., (2014).

Alguns estudos de exposição humana durante a última década têm mostrado efeitos sobre a reprodução, danos no DNA do esperma ROZATI et al., (2002), o início precoce da puberdade em mulheres WOLFF et al., (2010), anomalias no sistema de reprodução DESDOITS et al., (2012), a infertilidade ROZATI et al., (2002); TRANFO et al., (2012), desenvolvimento da tireóide MEEKER et al., (2007), asma e alergias JAAKKOLA et al., (2008), diabetes HUANG et al., (2014); JAMES-TODD et al., (2016); MAMTANI et al., (2016), dentre outros.

Outros estudos apoiam uma associação entre a exposição aos PEs e a marcadores da função testicular em homens, particularmente a diminuição da qualidade do sêmen (JOENSEN et al., 2012). Há também evidências de endometriose em mulheres com níveis elevados de MPEs (UPSON et al., 2013). Aumentos no índice de massa corporal (IMC) e o aumento da circunferência da cintura foi ligada à presença do DEHP, BzBP, DBP e DEP em homens e ao DEP em mulheres adolescentes e adultas HATCH et al., (2008); STAHLHUT et al., (2007). Um dos substituintes do DEHP o DiNP foi recentemente designado como um carcinogênico no Estado da Califórnia (US) (SERRANO et al., 2014).

Estudos sobre os efeitos dos PEs na saúde dos seres humanos ainda são controversos. Alguns resultados em populações humanas são consistentes com dados obtidos por meio de pesquisas com animais, por exemplo TRANFO et al., (2012) encontraram uma correlação positiva entre a exposição humana aos PEs e seus MPEs com efeitos adversos no sistema

reprodutivo. Contudo, outras pesquisas foram contrários a essa correlação. Segundo CHEVRIER et al., (2012), a exposição pré-natal aos PEs foi avaliada e nenhuma evidência no aumento do risco de anomalias genitais nas crianças que participaram do estudo foi observada. De acordo com LOMENICK et al., (2010) a associação entre a presença de PEs e puberdade precoce foi avaliada, e não foi observada uma relação positiva entre a exposição aos PEs e o surgimento de puberdade precoce em crianças do sexo feminino.

Logo, mais resultados sobre toxicidade em humanos, especialmente, sobre a ingestão diária populacional e a exposição em baixos níveis são necessários para estimar a dose de risco que esses tóxicos trazem para a saúde humana e, neste caso, limitar ou até mesmo proibir seu uso industrial (HERRERO et al., 2015).

### **3.2.5 - Aspectos Legais**

O registro, avaliação, autorização e restrição de substâncias químicas (*Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals - REACH*) é o regulamento da União Européia (*European Union- EU*) sobre os produtos químicos e a sua utilização segura que tem como principal objetivo melhorar o conhecimento dos perigos e riscos associados às substâncias químicas existentes, dentre eles os PEs. De acordo com a REACH os PEs de elevado peso molecular, tais como DINP, DIDP (Diisodecil ftalato) e DPHP (Dipropilheptil ftalato), constituem mais de 80% dos ftalatos utilizados na Europa e não aparecem como substâncias que podem causar problemas à saúde. Com base no princípio da precaução, considerou-se apenas que estes PEs não deveriam ser utilizados em brinquedos e artigos infantis que possam ser colocados na boca (Regulamento REACH - Anexo XVII, artigo 52.º) (VENTRICE et al., 2013).

Por outro lado, os PEs de baixo peso molecular, tais como DBP, BBP, DEHP e DIBP são classificados como substâncias muito perigosas no REACH. Com base em estudos com animais, as autoridades europeias classificaram-nas na categoria 1B, substâncias consideradas tóxicas para a reprodução. Por esta razão, os ftalatos de baixo peso molecular não podem ser utilizados na produção de brinquedos, artigos infantis, cosméticos e dispositivos médicos (VENTRICE et al., 2013).

O uso de PEs também é regulamentado na produção de embalagens e processamento de produtos alimentares. Com base no Regulamento REACH, após agosto de 2015, os PEs de baixo peso molecular só serão produzidos e vendidos após autorização específica (Regulamento REACH - Anexo XIV 21 de Novembro de 2012) (VENTRICE et al., 2013).

As restrições aos PEs não são apenas uma questão europeia, outros países (por exemplo, o Canadá e os Estados Unidos, China, Coreia do Sul) também apresentam políticas que restringem ou proíbem seu uso KIM et al., (2016); KIM et al., (2014); SERRANO et al., (2014); VENTRICE et al., (2013)

No Brasil, em Janeiro de 2007, o Ministério da Economia e da Inovação, por meio do Decreto-Lei N° 10/2007 limitou o uso do DEHP, DBP, DINP, DNOP (di-n-octil ftalato), que não permite mais que 0,1% em massa de ftalatos em brinquedos e artigos de infantis. (BRASIL, 2007)

A Resolução n° 17, de 17 de março de 2008, publicada pela ANVISA, estabelece o limite de migração específica para o DEHP de  $1,5 \text{ mg kg}^{-1}$  de embalagens para alimentos gordurosos. A resolução permite o uso do plastificante em materiais reutilizáveis que estejam em contato com alimentos não gordurosos (ANVISA, 2008).

O Brasil limita o uso de DBP em  $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$  na produção de embalagens para alimentos, proibindo o uso em revestimentos que estejam em contato com alimentos gordurosos e estabelece limites de  $0,6$  e  $0,25 \text{ mg kg}^{-1}$  para o DEHP e DMP no solo,  $8$ ,  $14$ ,  $0,7 \mu\text{g L}^{-1}$  para o DEHP, DMP e DBP, na água, respectivamente. Para o DEP seu uso é permitido somente na produção de adesivos e componente de recobrimentos resinosos e poliméricos. Em alimentos com conteúdo de gordura superior a 5% m/m, somente está permitido o uso em quantidades inferiores a 5% m/m em material plástico ANVISA, (2008); BRASIL,(2009).

Neste contexto, é possível afirmar que com um mercado global cada vez maior, a contaminação por ftalatos é uma questão de saúde pública que atravessa as fronteiras internacionais (SERRANO et al., 2014).

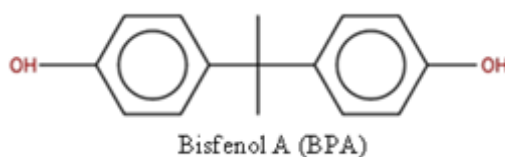
### **3.3 - Bisfenol A**

#### **3.3.1 - Aspectos gerais**

O bisfenol A (BPA) é um composto orgânico, em forma de sólido branco cristalino constituído por dois anéis fenólicos em sua estrutura (Fig. 5) (BERNARDO et al., 2015). É produzido industrialmente em larga escala em todo mundo e sua demanda mundial cresce entre 6 e 10% por ano. Da sua produção 95% é destinada à fabricação de polímeros sintéticos e para a produção de policarbonato (PC). Outras aplicações menos significativas são a



produção de policloreto de vinila (PVC), na fabricação de papel térmico, poliuretano, poliamida, retardante de chama e na preparação de resinas epóxi (BERNARDO et al., 2015).



**Figura 5.** Estrutura do Bisfenol A.

As resinas epoxi são encontradas em uma gama de produtos de consumo, incluindo garrafas plásticas, recipientes para alimentos, resinas compostas, materiais de revestimento para tubos de PVC, revestimento interno de latas para armazenar alimentos e bebidas e muitos outros produtos para uso cotidiano. Embora o BPA seja um composto resistente, sua liberação no ambiente pode ocorrer através da polimerização incompleta ou hidrólise causada por aquecimento (GOLOUBKOVA et al., 2000). Como o BPA pode ser liberado no ambiente e contaminar o ar, alimentos e água, conseqüentemente, humanos e animais, ele é considerado como um potencial poluente ambiental (DI DONATO et al., 2017).

### 3.3.2 - Formas de exposição

A exposição humana ao BPA ocorre, por via ocupacional, ambiental e alimentar. A exposição ocupacional ocorre, sobretudo em trabalhadores de indústrias que sintetizam o composto, ou na síntese de policarbonato (PC) e na produção de artigos de PC, resinas epóxi, PVC e papel térmico (BERNARDO et al., 2015). A exposição ambiental resulta da contaminação atmosférica, aquática e dos solos com o BPA proveniente de plásticos descartados indevidamente pela população. Isso ocorre principalmente devido ao tratamento ineficiente de esgoto e/ou descarte indevido de efluentes industriais (ELIAS et al., 2016). Outra via de exposição humana importante, e que vem crescendo cada dia mais, é através de tratamentos dentários com selantes e resinas que apresentam um compósito à base de BPA em sua constituição. Esse material é empregado, pois possui boas propriedades mecânicas, estabilidade química e tem capacidade para simular a cor natural do dente (BERNARDO et al., 2015).

Pode-se considerar a ingestão de alimentos e bebidas como uma importante fonte de exposição humana ao BPA, pois estes permanecem em contato com resinas epoxi ou plásticos de PC (HOFFMANN et al., 2016). O polímero de PC após síntese é extremamente

estável, no entanto, estudos revelam que pode ocorrer hidrólise sob certas condições de temperatura e pH com conseqüente liberação de compostos químicos, inclusive o BPA. (BERNARDO et al., 2015).

Um estudo realizado por LORBER et al., (2015) com 204 alimentos frescos, enlatados e congelados determinou que 73% das amostras de alimentos enlatados continham o BPA. Outro estudo desenvolvido por CAO et al., (2011) determinou que, das amostras de alimentos enlatados coletadas, 36% apresentaram migração do BPA e dentre essas as conservas de peixes ( $106 \text{ ng g}^{-1}$ ), conserva de milho ( $83,7 \text{ ng g}^{-1}$ ) e sopas enlatadas ( $22,2 - 44,4 \text{ ng g}^{-1}$ ) apresentaram concentração de BPA muito acima do limite de migração permitido ( $0,6 \text{ ng g}^{-1}$ ) (HOFFMANN et al., 2016)

O BPA tem sido encontrado em diversos produtos a base de carne ( $0,49 - 56 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ ), peixes ( $7,1 - 102,7 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ ), verduras e frutas ( $11,0 - 95,6 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ ) e cereais ( $1,0 - 3,8 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ ), água potável ( $14 \text{ ng L}^{-1}$  e  $1,3 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ), solo ( $<0,1 - 1000 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ ) e ar ( $< 1000 \text{ ng m}^{-3}$ ) BERNARDO et al., (2015); HOFFMANN et al., (2016).

A ingestão de alimentos contaminados é a forma mais preocupante de exposição por atingir potencialmente um maior número de pessoas e porque, neste caso a exposição pode ocorrer durante longos períodos (possivelmente toda a vida) em pequenas doses e sem serem detectadas (HOFFMANN et al., 2016).

### **3.3.3 - Toxicocinética**

#### ***3.3.3.1 - Absorção e distribuição***

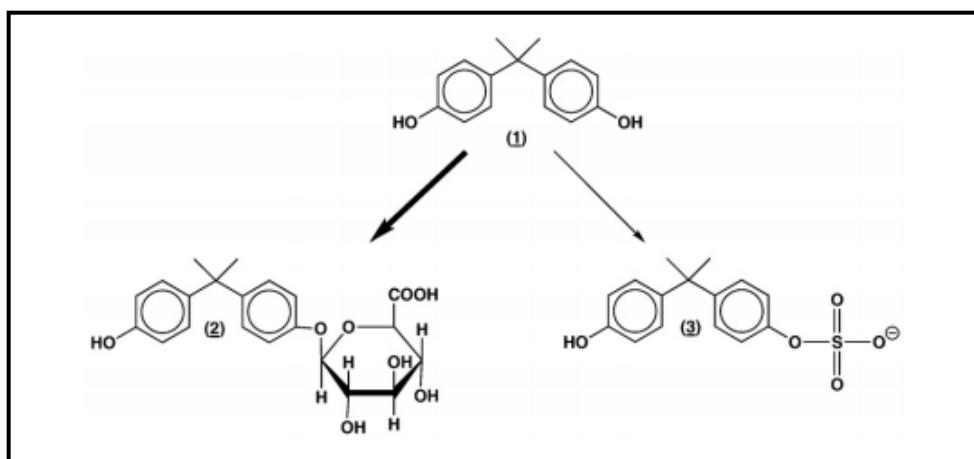
Após administração oral o BPA sofre um metabolismo rápido no intestino e fígado e é completamente absorvido pelo trato gastrointestinal ( $> 95\%$  da dose). Quando a exposição ocorre por inalação ou contato dérmico o BPA atinge níveis sanguíneos mais elevados em primatas do que em ratos, e a eliminação ocorre de forma mais lenta BERNARDO et al., (2015); LINHARES JUNIOR et al, (2012); SILVA et al., (2016).

Sua distribuição é extensa e ocorre em diversos órgãos como fígado, rins, tecido adiposo, medula óssea, testículos, placenta, cordão umbilical e feto KIM et al., (2004); SILVA et al., (2016)

### 3.3.3.2 - Biotransformação e Excreção

A avaliação da biotransformação do BPA no organismo humano após administração oral é a mais relevante, pois como foi dito anteriormente, considera-se que a principal forma de exposição humana a esse composto é através da ingestão de alimentos contaminados (DEKANT et al., 2008).

A conjugação com o ácido glucurônico e a sulfatação são as principais formas de biotransformação deste xenobiótico no organismo humano (Fig.6), sendo que a glucoronidação ocorre em maior extensão. Ambas são consideradas reações de detoxificação pois os metabólitos formados são isentos de atividade estrogênica (DEKANT et al., (2008); LINHARES JUNIOR et al., (2012).



**Figura 6.** Biotransformação do bisfenol A: (1) Bisfenol A; (2) Bisfenol A-Glicuronato; (3) Bisfenol A-Sulfato. Fonte: DEKANT et al., (2008)

O BPA é rapidamente conjugado com o ácido glucurônico na parede do intestino e fígado. O metabólito conjugado é transportado para o sangue até atingir os rins e ser excretado pela urina, com semi-vida terminal de 6h. Isso possibilita que a exposição ao BPA seja estimada por meio dos níveis urinários (BERNARDO et al., 2015).

Evidências recentes sugerem que em baixas concentrações, o BPA tem afinidade lipofílica, esta característica indica alto potencial de bioacumulação no organismo humano, desta forma o BPA tem a possibilidade de exercer efeitos metabólicos contínuos acarretando no surgimento de diversas doenças (BERNARDO et al., 2015).

### 3.3.4 - Tóxicodinâmica

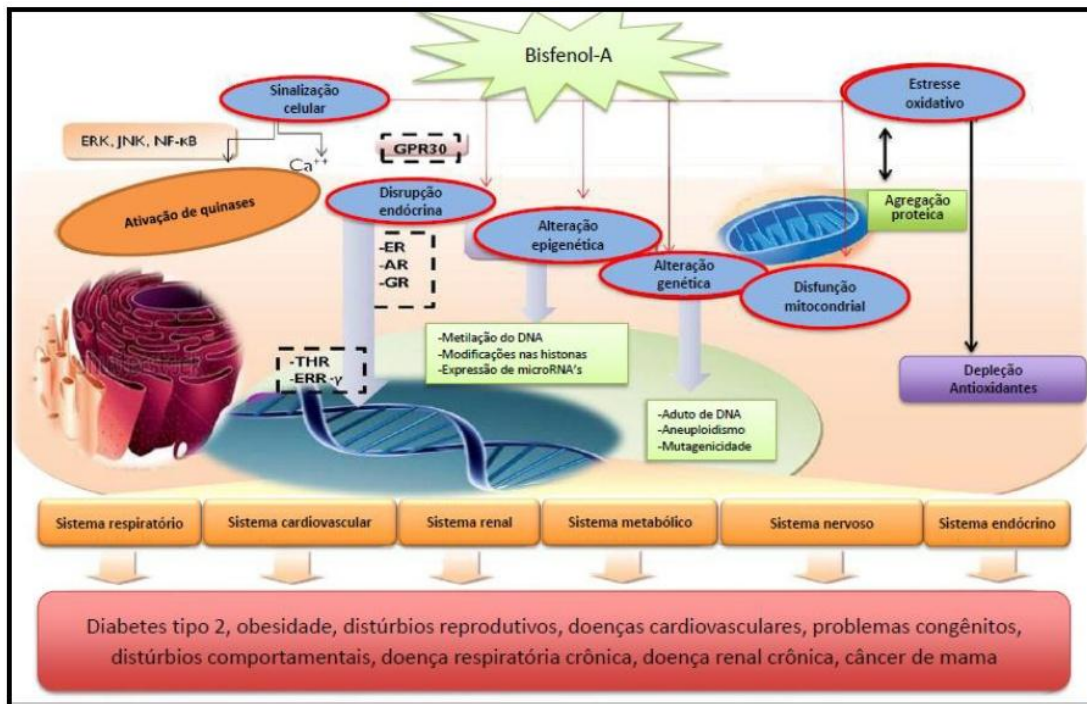
#### 3.3.4.1- Mecanismos de ação

O BPA também tem atraído a atenção de agências reguladoras e de cientistas, em dezenas de países, por se tratar de uma substância estrogênica, que tem afinidade pelo receptor de estrogênios (*Estrogenic Receptor*- ER) e que pode interferir na função não só do sistema endócrino, mas afetar outros sistemas do corpo, incluindo o imunológico e nervoso BERNARDO et al., (2015); HOFFMANN et al., (2016)

A atividade estrogênica do BPA foi comprovada acidentalmente por pesquisadores na Universidade de Stanford, eles perceberam que a migração do composto das vidrarias de polycarbonato autoclavadas aumentavam a taxa de proliferação de células de câncer de mama MCF-7 em ratos de laboratório. O composto apresenta potencial de ligação a receptores estrogênicos nucleares e de membrana ( ER- $\alpha$ / ER- $\beta$ ), desencadeando ação esteróide genômica e não genômica. Os mecanismos envolvidos na regulação de genes mediada pelos receptores de estrógeno são muito complexos, e dependem de vários fatores específicos de cada tecido LINHARES JUNIOR et al., (2012); SILVA et al., (2016).

No que concerne ao potencial carcinogênico, por exemplo, o BPA poderia interferir na regulação da síntese do material genético, levando um estado de proliferação celular patológica, na hipófise, mama e útero, por exemplo. E poderia por mecanismos similares a outros estrogênios, produzir os mesmos efeitos através da indução de fatores de crescimento e proto-oncogene (gene normal que se torna oncogene devido à mutação ou aumento da expressão gênica) (GOLOUBKOVA et al.; 2000).

Até recentemente o BPA era considerado um estrógeno sintético fraco, acreditava-se que este seria 1000 a 2000 vezes menos potente do que o estrógeno natural. No entanto, alguns estudos recentes demonstraram uma variedade de caminhos (Fig.7) pelos quais o BPA pode estimular respostas celulares, mesmo em doses baixas, e provavelmente ser tão potente quanto os estrógenos naturais (SILVA et al., (2016).



**Figura 7.** Mecanismo celular e molecular do BPA na indução de doenças crônicas em humanos. AR: receptor andrógeno, ER: receptor estrógeno, ERK: proteína quinase regulado por sinais extracelulares, ERR- $\gamma$ : receptor gamma relacionado ao estrógeno. GPR 30: proteína G acoplada ao receptor 30, GR: receptor de glicocorticóides, JNL: proteína quinase c-Jun N-terminal, NF- $\kappa$ B: fator nuclear kappa B, THR: receptor de hormônios da tireóide. Fonte: REZG et al., (2014); SILVA et al., (2016)

Devido a essas características anteriormente descritas, muito ainda deve ser estudado com o objetivos de relacionar a presença do BPA com diferenças doenças crônicas desenvolvidas em humanos, e entender melhor os seus mecanismos de ação.

### 3.3.4.2 - Efeitos

Estudos mostraram que a exposição ao BPA pode ser relacionada com a obesidade adulta e infantil SAVASTANO et al., (2015); LI et al., (2013); BHANDARI et al.; (2013) diabetes (KIM et al.; 2013), doença cardíaca (MELZER et al., 2010), abortos recorrentes SHEN et al., (2015), ansiedade, depressão e hiperatividade em crianças BRAUN et al., (2011); HARLEY et al., (2013).

O BPA também está associado a infertilidade em mulheres CASERTA et al., (2013), desenvolvimento de endometriose e ovários policísticos ZANATTA et al., (2013), e na indução da proliferação de células de câncer de mama e próstata (INOUE et al., 2000).

Um estudo realizado na Tailândia AEKPLAKORN et al., (2015) apontou que em 2.581 amostras de soro escolhidas aleatoriamente dentre uma população de 21.960 pessoas 78,1% das amostras apresentou concentração de BPA em média de  $0,34 \text{ ng mL}^{-1}$ . Os autores concluíram também que os níveis séricos de BPA foram maiores dentre os diabéticos do sexo masculino do que para a população que apresentava níveis glicêmicos normais.

Uma pesquisa realizada na China investigou a relação entre concentração de BPA urinário e abortos recorrentes. O grupo foi formado por 102 pacientes com abortos recorrentes e 162 controles (sem histórico de aborto espontâneo ou complicações na gravidez). Os autores encontraram  $0,98 \pm 2,67 \mu\text{g g}^{-1}$  de BPA para o grupo análise e  $0,40 \pm 0,77 \mu\text{g g}^{-1}$ , para o grupo controle. Dessa forma, os autores concluíram que existe uma associação entre o aumento da concentração de BPA urinário e o aumento do risco de abortos recorrentes (SHEN et al., 2015).

Apesar de existirem evidências sobre o potencial de exposição destes componentes, muito ainda deve ser avaliado e estudado, antes de construir uma conclusão definitiva sobre o efeito desses disruptores na saúde humana e animal (TEEGUARDEN et al., 2013).

### **3.3.5 - Aspectos Legais**

A autoridade europeia para segurança alimentar (*European Food Safety Authority – EFSA*), definiu em 2006 que a Ingestão Diária Aceitável (IDA) para o BPA fosse de  $0,05 \text{ mg BPA/kg}$  de peso corporal (pc)/dia (BERNARDO et al., 2015).

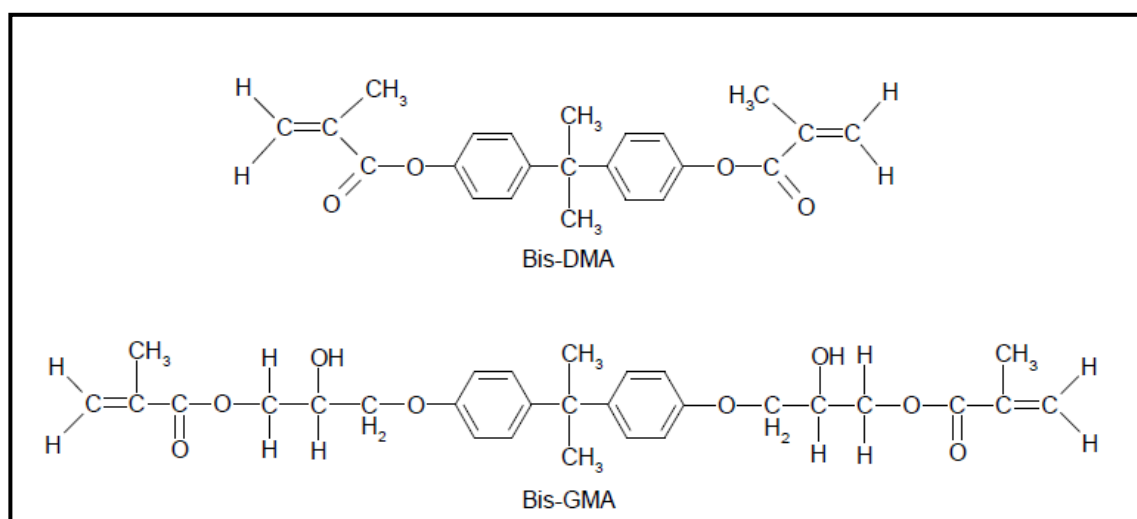
Além disso, a EU publicou o Regulamento nº 321/2011, que estabelece o limite de migração específica (LME) de  $0,6 \text{ mg}$  de BPA/kg de alimento e a proibição do policarbonato na fabricação de mamadeiras destinadas a lactentes (BERNARDO et al., 2015).

No Brasil, A Resolução RDC nº 56/2012, de 16 de novembro de 2012 da ANVISA, segue a legislação europeia com o LME de  $0,6 \text{ mg}$  de BPA por kilo de alimento e não autoriza o uso de bisfenol A em polímeros utilizados na fabricação de mamadeiras e artigos similares destinados a alimentação de lactantes (ANVISA,2012).

### 3.4 - Disruptores endócrinos em materiais odontológicos

Os efeitos adversos do uso de materiais que contenham BPA já foram reportados em diversos trabalhos na área da medicina, entretanto pouco se sabe sobre o uso desse componente em materiais odontológicos. Devido à difusão do uso de materiais resinosos para tratamentos odontológicos nos últimos anos, muitos estudos começaram a avaliar a presença desse composto na saliva, urina e sangue de pacientes que foram submetidos a tratamentos com resinas e selantes dentários (MOREIRA et al., 2017).

As resinas dentárias são constituídas de duas partes: uma orgânica e a outra inorgânica. Na parte orgânica, encontramos em geral monômeros do tipo Bisfenol A- Glicidil Metacrilato (Bis-GMA) e Bisfenol A – Dimetacrilato (Bis-DMA) como apontado na figura 8, sendo que o BPA é precursor desses monômeros. Quando a resina é aplicada a polimerização acontece *in situ* através da foto-ativação, porém o que ocorre é que durante o processo de cura nem todos os monômeros são convertidos e desta forma o BPA pode migrar da resina para cavidade bucal do paciente (MONTAGNER et al., 2003).



**Figura 8.** Resinas compostas derivados do BPA. Fonte: SÖDERHOLM et al., (1999).

Diversos estudos identificaram a presença do BPA e outros metabólitos na saliva e urina de pacientes que passaram por tratamento dentário com resina composta JOSKOW et al., (2006); MONTAGNER et al., (2003); MOREIRA et al., (2017); SASAKI et al., (2005).

KINGMAN et al., (2012) analisaram a saliva de 172 pacientes e encontraram altos níveis de BPA até uma hora depois do tratamento, desaparecendo na saliva em até 8h, e aumentando em 43% os níveis urinários entre 9-30 h após o procedimento odontológico.

Esta migração é preocupante, pois, os monômeros livre de BPA podem interagir com distintos receptores e estruturas celulares, ativando reações tóxicas, alérgicas, inflamatórias e

carcinogênicas - não só para cavidade oral, mas também para via gastrointestinal e demais tecidos que os absorverem (LOPEZ et al., 2015).

### **3.5 - Disruptores associados à carcinogênese**

O BPA, além de estar associado a diversas doenças do sistema reprodutor e endócrino pode participar da indução de câncer em diferentes sistemas do organismo. Diversos estudos sugeriram que o BPA pode atuar como agente cancerígeno no surgimento de tumores malignos em glândulas mamárias, no desenvolvimento de câncer de próstata e contribuem para a indução de tumores em tecidos de animais experimentais (ACEVEDO et al., 2013; HUFF et al.; 2001; SOTO et al., 2013). Estes fatos podem ser explicados, pois o BPA pode participar de diversos processos celulares, como por exemplo, a metilação do DNA, remodelação da cromatina durante o desenvolvimento do organismo e a forte afinidade que este composto apresenta em se ligar com os receptores de estrógeno (SILVA, M. et al., 2016).

Desde os anos 80 são publicados relatos sobre os ftalatos serem potenciais indutores de tumores malignos em animais de laboratório (CHOU et al.; 2006). Com relação à exposição humana LÓPEZ et al., (2010) quantificaram ftalatos, na urina de 223 pacientes com câncer de mama e 221 controles. Assim, a concentração urinária do MEP (monoetil ftalato) foi positivamente associada ao câncer de mama, entretanto, as concentrações urinárias dos metabólitos de outros ftalatos, do (MBzP (monobenzil ftalato) e do mono-3-carboxipropil ftalato foram inversamente associadas à esse tipo de câncer (SANTOS et al., 2013).

A agência de proteção ambiental americana (*US Environmental Protection Agency* - EPA) classificou o DEHP como potencial carcinogênico e estimou com base em modelos matemáticos e resultados obtidos com animais, a probabilidade de uma pessoa desenvolver câncer ingerindo água contaminada com o composto aumenta de forma direta com a quantidade do composto ingerido (HEUDORF et al., 2007). Em estudos com roedores, foi constatado que o DEHP pode causar cancro hepático e o DINP pode causar carcinoma renais e hepáticos, entretanto em relação aos humanos investigações indicam que, para alguns ftalatos, o efeito seja menor do que aquele demonstrado em animais de laboratório (EPA, 1999).

Na literatura não existem relatos que atribuam à presença de PEs, MPes e BPA em fluidos biológicos com o desenvolvimento de carcinoma de células escamosas de boca (CCE). Existe apenas uma hipótese que esta poderia ser responsiva ao BPA, logo uma



investigação mais completa deve ser feita neste caso CHANG et al., (2014); COLELLA et al., (2011).

### 3.6 - Disruptores em amostras biológicas

A análise dos MPEs e BPA em fluidos biológicos tais como saliva e urina exige um preparo prévio da amostra, no qual é necessário realizar um processo de hidrólise do metabólito conjugado. Esta hidrólise normalmente é feita com enzimas específicas. Para a desconjugação, as enzimas  $\beta$ -glucuronidase BLOUNT et al., (2000) e  $\alpha$ - glucuronidase GREEN et al., (1996) são as indicadas.

Alguns fatores no processo de hidrólise como a quantidade de enzima utilizada e o tempo ideal de incubação devem ser controlados para garantir a eficiência da hidrólise. A quantidade de enzima necessária dependerá da quantidade de amostra inicial. FREDERIKSEN et al.; (2010) utilizaram 5,00  $\mu$ L de enzima para 500,00  $\mu$ L de amostra, DEWALQUE et al., (2014) utilizaram 15,00  $\mu$ L de  $\beta$ -glucuronidase para 3,00 mL de amostra de urina; HERRERO et al., (2015) utilizaram 5,30  $\mu$ L para 0,50 mL de amostra.

Vários autores obtiveram a hidrólise completa em diferentes tempos de incubação. FERNANDEZ et al.,(2016); FREDERIKSEN et al., (2010); RAMESH et al.,(2016) utilizaram um tempo de 90 min e uma temperatura de 37 °C enquanto que HERRERO et al., (2015); KIM et al., (2014); RASTKARI et al., (2013) utilizaram 120 min em um banho térmico com agitação à 65°C para completa hidrólise.

O pH da hidrólise também 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 FERNANDEZ et al., (2016); FREDERIKSEN et al., (2010) ou o ajuste de pH HOLM et al., (2004) pode ser feito. A hidrólise é interrompida com a adição de ácido (pH em torno de 2) na amostra, os mais utilizados são o ácido fosfórico, acético e sulfúrico (FREDERIKSEN et al., (2010); HERRERO et al., (2015); SONG et al., (2013).

Após a hidrólise os analitos são extraídos da amostra. Diversos métodos de extração podem ser aplicados como a extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction - SPE*), LLE e HF-LPME, como pode ser observado na tabela 3, que apresenta trabalhos recentes para determinação de BPA e MPEs em fluidos biológicos.

Tabela 3. Estudos recentes envolvendo a análise de PEs, metabólitos de PEs e BPA em fluidos biológicos

Referência	Analitos	Matriz	Técnica extração	Técnica Análise	Limites (ng/mL)	Faixa Linear (ng/mL)
Jung (2013)	MBP	Plasma	SPE	GC/MS	2,57-7,50 (LOQ)	2.38-95.83
	MEHP				0,78-2,27(LOD)	10.36-161.18
Rastkari (2013)	MMP	Urina	CNT*	GC/MS	0,025-0,05 (LOD)	0.250-250
	MEP				0,125-0,250 (LOQ)	0.250-250
Kim (2014)	MBP	Urina	LLE	GC/MS	0,05-0,2(LOD) 0,1-0,5 (LOQ)	0.250-250
	MEHP					0.250-250
	MBzP					0.250-250
	MMP					0.2-100.0
	MEP					0.2-100.0
	MiBP					0.2-100.0
	MBP					0.05-100.0
MBzP	0.2-100.0					
Herrero (2015)	MEHP	Urina	SPE	GC/MS	0,03-1,63 (LOD) 0,10-29,6 (LOQ)	0.2-100.0
	5-OH MEHP					0.2-100.0
	5oxoMEP					0.2-100.0
	5cxMEPP					0.1-100.0
	MMP					0,08-0,49 (LOD)
	MEP					0,28-1,65(LOQ)
	MiBP					-
MBP	-					
Kumar (2016)	MBzP	Urina	LLE e SPE online	GC/MS	0,03-25 (LOD)	-
	MEHP					-
	OHMPHPoxoMPP					-
	cxMPHP, MEHP MEOHP MEHHP MECPP MEPMiBpMnBP					-
Fernandez (2016)	MBzP, MiNP	Urina	HF-LPME	GC/MS	0,8-23,3 (LOD) 1,29-38,9 (LOQ)	20-1000
	MMP					40-1000
	MiBP					20-500
	MBP					5-100
	MCHP					10-200
	MEHP					5-200
	MiNP					40-1000
	MOP					20-100
	MBzP					5-100
Moreira (2017)	BPA	Urina	LLE	GC/MS	0,90 ng g <sup>-1</sup> (LOQ)- Urina	-
	BPA	Saliva				0,49 ng g <sup>-1</sup> (LOQ)- saliva

\*CNT: Nanotubos de Carbono; UHPLC : Cromatografia líquida de ultra eficiência

Como pode ser observado existem vários trabalhos que quantificaram estes componentes na urina humana, entretanto na literatura existem poucos estudos que identificaram a presença de PEs na saliva humana. SOFOU et al ., (2005) comprovaram a migração dos ftalatos DOP e DBP de diversas marcas de resinas acrílicas para saliva artificial na ordem de ng/μL, alíquotas de hora em hora das diferentes soluções de resina com saliva

foram retiradas e as análises foram realizadas por cromatografia líquida sendo que os autores obtiveram limites entre 0,02 - 0,1 ng/μL. LYGRE et al., (1993) identificaram a migração do DBP e DCHP de próteses dentárias para saliva real, eles obtiveram limites entre 0,1 - 7,5 μg/mL. Os autores extraíram os analíticos da saliva com 1mL de acetato de etila e analisaram por GC/MS.

### 3.7- Microextração em fase líquida –LPME

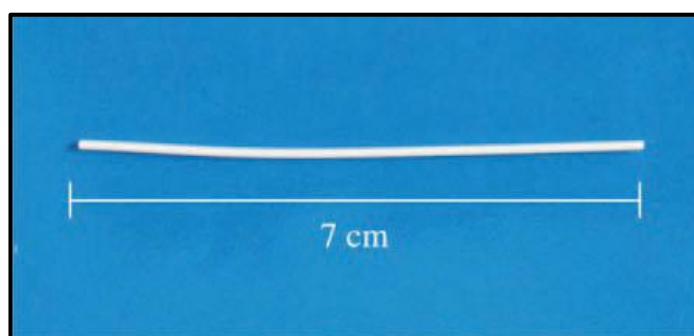
Técnicas de determinação tais como a cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography- HPLC*), cromatografia gasosa (*Gas chromatography- GC*) e eletroforese capilar (*Capillary Electrophoresis- CE*) são amplamente utilizadas em análises de matrizes complexas. Entretanto, a determinação dos analitos nessas matrizes requer um tratamento prévio da amostra com o objetivo de extração e pré-concentração. Isso é necessário, por exemplo, na análise de fármacos e metabólitos em fluidos biológicos, pois os compostos endógenos presentes nas amostras podem ser adsorvidos no recheio da coluna, diminuindo sua eficiência e dificultando a determinação do analito. As técnicas de extração comumente usadas para esse objetivo são a LLE e a extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction-SPE*) essas técnicas requerem longos períodos de execução e alto consumo de solvente (MAGALHÃES et al., 2009).

Neste contexto, surge a tendência de miniaturização das técnicas de preparo de amostra como por exemplo a microextração em fase líquida (*Liquid-Phase Microextraction-LPME*), microextração em fase sólida (*Solid-Phase Microextraction-SPME*), microextração em gota suspensa (*Single Drop Microextraction- SDME*) e a microextração líquido-líquido dispersiva (*Dispersive Liquid-Liquid Microextraction-DLLME*). A LPME é a miniaturização da LLE e desta forma é possível diminuir a quantidade do solvente de extração em comparação com o volume de amostra, a LPME também trouxe uma maior liberdade na seleção do solvente de extração para diferentes analitos e, como utiliza uma quantidade mínima de solvente orgânico, diminuiu a exposição do operador a solventes tóxicos além do que, o solvente pode ser injetado diretamente no sistema cromatográfico ALSHARIF et al., (2016); XU et al., (2007).

Uma promissora evolução da LPME é a microextração em fase líquida empregando membranas cilíndricas ocas (*Hollow Fiber Liquid-Phase Microextraction - HF-LPME*) introduzida por Pedersen–Bjergaard em 1999 (PEDERSEN et al., 1999).

Na técnica desenvolvida por eles, uma membrana cilíndrica oca, porosa e hidrofóbica (Fig. 9) com diâmetro interno de 600  $\mu\text{m}$ , paredes com espessura de 200  $\mu\text{m}$  e poros de 0,2  $\mu\text{m}$ , é impregnada com um solvente orgânico imiscível em água e o lúmen da mesma é preenchido com microlitros de uma fase aceptora. As duas extremidades da membrana são conectadas a duas microseringas que servem para a introdução e retirada da fase aceptora. Dessa forma, a membrana atua como uma barreira entre as fases doadora (amostra) e aceptora, permitindo a aplicação de agitação. Como a membrana empregada possui poros de tamanho reduzido, as macromoléculas presentes na amostra não são extraídas. Para evitar a ocorrência de contaminação entre as análises, cada unidade de extração é utilizada uma única vez (MAGALHÃES et al., 2009).

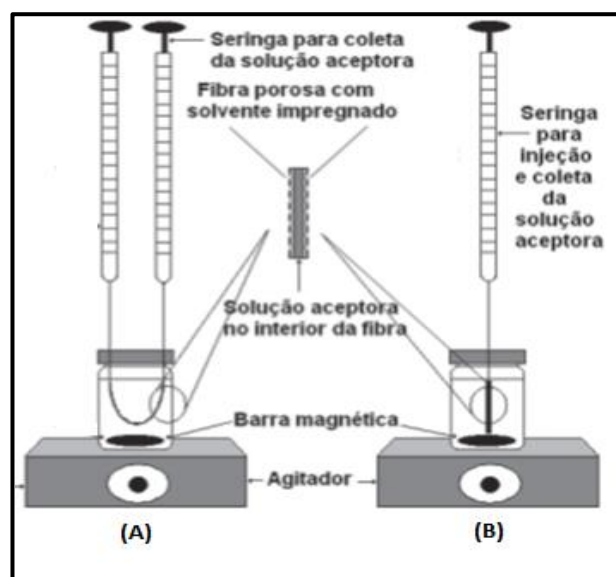
Dentre as várias tentativas para miniaturização da LLE, a microextração em fase líquida empregando membranas cilíndricas ocas (HF-LPME) é a que obteve maior sucesso, por combinar o conceito de extrações com membranas ao uso reduzido de razões solvente orgânico/fase aquosa, boa seletividade, altas taxas de concentração do analito encontradas no extrato final (enriquecimento) além de conservar os princípios observados na LLE convencional (MAGALHÃES et al., 2009).



**Figura 9.** Membrana de polipropileno usada na HF-LPME

A técnica tem um amplo potencial de aplicação em áreas como análise de fármacos e monitoramento ambiental e é compatível com uma gama de amostras, incluindo plasma, sangue total, urina, saliva, leite materno, água da torneira e água superficial (YAMINI et al.; 2016).

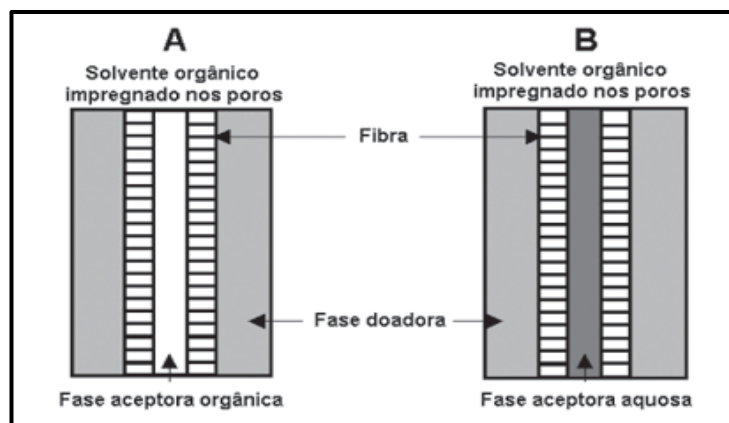
Há duas configurações principais em que a LPME é empregada: configuração em “U” (A), que utiliza duas microseringas conectadas à fibra (mais empregada) e, configuração tipo “haste” (“rod-like”) (B), onde somente uma microseringa é utilizada para injetar e coletar a fase aceptora (Fig.10) (OLIVEIRA et al., 2008).



**Figura 10.** Representação esquemática da microextração em fase líquida utilizando fibra oca com configuração A) em U; B) em haste. Adaptado de OLIVEIRA et al., (2008).

Dependendo da solução aceitadora o sistema HF-LPME pode ser dividido em duas fases ou três fases como mostra a figura 11.

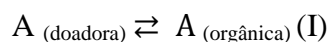
- i. Duas fases: a solução aceitadora é o próprio solvente orgânico utilizado na impregnação dos poros da membrana. Nesse sistema deve-se ficar atento ao pH da fase doadora para manter todos os analitos no seu estado não ionizado. A LPME de 2 fases é utilizada para extrair analitos de característica neutra ou de baixa polaridade.
- ii. Três fases: A solução aceitadora apresenta um pH diferente da fase doadora. Assim, logo que o analito sai da fase doadora (neutro) ele passa pelo solvente que está impregnado nos poros da membrana e é ionizado quando atinge a fase receptora, logo fica impedido de voltar novamente para a fase doadora. O sistema de três fases é mais indicado para analitos moderadamente hidrofóbicos com grupos ionizáveis (ácidos ou bases fracas) (HO et al.; 2002).



**Figura 11.** Modos de extração utilizados na microextração em fase líquida (HF-LPME): duas fases (A) e três fases (B). Adaptado de OLIVEIRA et al., (2008)

### 3.7.1 - Recuperação e fator de enriquecimento

Em um sistema de duas fases a transferência dos analitos da fase orgânica para a fase aquosa pode ser descrita pelo seguinte equilíbrio:



onde A representa o analito de interesse. Nesse caso, o coeficiente de partição do analito entre a fase orgânica e a fase doadora  $K_{org/d}$  é dado por:

$$K_{org/d} = \frac{C_{,org}}{C_{,d}} \text{ (II)}$$

$C_{org}$  = é a concentração de A na solução orgânica (acceptora) em equilíbrio.

$C_d$  = é a concentração de A na solução doadora em equilíbrio.

A recuperação (R) pode ser definida como a quantidade total de analito, em porcentagem, que é transferida para a fase aceitadora ao final da extração e depende do volume total da fase orgânica, do volume da amostra, do coeficiente de partição e pode ser expresso pela seguinte relação (RASMUSSEN et al.; 2004):

$$R = \frac{K_{org/d} * V_{org}}{K_{org/d} * V_{org} + V_d} * 100 \text{ (III)}$$

$V_{org}$  = volume total de fase orgânica no sistema (soma do solvente orgânico presente nos poros da membrana e no lúmen da fibra).

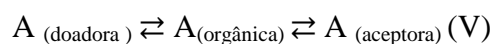
$V_d$  = volume total da amostra.

O fator de enriquecimento (F.E) é considerado outro parâmetro usado para demonstrar a eficiência dos processos de LPME, que informa o grau de concentração do analito que ocorreu durante a extração. O fator de enriquecimento (F.E) de um analito pode ser calculado pela fórmula (IV) (RASMUSSEN et al.; 2004).

$$F.E = \frac{V_d * R}{100 * V_{org}} \quad (IV)$$

Sendo assim, conclui-se que a extração em duas fases é favorecida para analitos hidrofóbicos, ou seja, com elevados coeficientes de partição (500–1000 ou maiores). Adicionalmente, a recuperação pode ser favorecida aumentando-se a razão entre as fases aceptora e doadora, utilizando-se fibras mais longas ou com maior diâmetro interno. Para LPME de duas fases, a recuperação real é menor que aquela calculada pela equação acima pois a fração de solvente orgânico que se encontra imobilizado nos poros da fibra oca microporosa não está disponível para análises posteriores; somente a fração presente no lúmen pode ser coletada pela microsseringa HO et al., (2002); OLIVEIRA et al., (2008)

Para o sistema de três fases a transferência dos analitos é definida pelo seguinte equilíbrio:



Assim o mesmo cálculo teórico pode ser feito para o sistema de três fases e a recuperação e o fator de enriquecimento é dado pelas expressões (VI) e (VII) respectivamente.

$$R = \frac{100 K_{a/d} * V_a}{K_{a/d} * V_a + * V_{org} * K_{org,d} + V_d} * 100 \quad (VI)$$

$$F.E = \frac{V_d * R}{100 * V_a} \text{ (VII)}$$

$K_{a/d} = (K_{org/d} * K_{a/org})$  coeficiente de partição entre a fase aceptora e a fase doadora.

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

$V_a$  = Volume da fase orgânica.

$V_d$  = Volume da fase doadora.

### 3.7.2 - Parâmetros que afetam a extração HF-LPME

Além das características inerentes do analito outros fatores têm sido considerados como base para o processo de otimização, a fim de conseguir uma extração eficiente. O rendimento pode ser aumentado testando diferentes solventes, escolhendo a melhor membrana capilar, adicionando sais na solução doadora (efeito “*salting out*”), controlando tempo, temperatura e agitação do sistema ALSHARIF et al., (2016); HO et al., (2002); OLIVEIRA et al., (2008)

#### 3.7.2.1- Solvente orgânico

A seleção de um solvente orgânico adequado é um passo crítico para uma extração eficiente. Algumas propriedades são necessárias para um solvente orgânico ser empregado em LPME, dentre elas: a afinidade do solvente com os analitos alvo, miscibilidade em água, volatilidade, estabilidade durante o processo de extração, compatibilidade com a membrana capilar utilizada bem como compatibilidade com instrumentos analíticos (detector). Tipicamente o tolueno e o n-octanol são os solventes orgânicos mais empregados ALSHARIF et al., (2016); OLIVEIRA et al., (2008).

#### 3.7.2.2 - Tempo

A eficiência da LPME depende significativamente do tempo de extração no qual a maior eficiência de extração é alcançada na condição de equilíbrio, nesse ponto a distribuição do analito entre as fases permanece constante. Em HF-LPME, o tempo de equilíbrio é geralmente 30-60 min sem a perda de solvente orgânico ALSHARIF et al., (2016); OLIVEIRA et al., (2008).



### **3.7.2.3 - Temperatura**

A LPME é comumente executada em temperatura ambiente, para evitar a perda de solvente por evaporação e a formação de bolhas. Alguns estudos CHIMUKA et al., (2009); MICHEL et al., (2009), reportaram que não houve aumento notável na eficiência de extração aumentando a faixa de temperatura de 5 ° C a 40 ° C mesmo que o coeficiente de difusão e a transferência de massa tenham aumentado ALSHARIF et al., (2016); OLIVEIRA et al., (2008).

### **3.7.2.4 - Agitação**

A agitação do sistema de extração, normalmente é empregada para acelerar a cinética da extração, favorecendo a difusão dos analitos através da interface fase doadora- solvente orgânico aumentando a eficiência do processo (ALSHARIF et al., 2016).

## **3.7.3 - Aplicações da HF-LPME**

Na literatura podem ser encontrados alguns trabalhos que utilizaram HF-LPME para extrair e pré-concentrar BPA, MPEs e PEs em diferentes matrizes. FERNANDEZ et al., (2016) determinaram nove metabólitos de ftalatos e BPA em amostras de urinas com análise por GC/MS e obtiveram limites de detecção (0,7 - 23,3  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) satisfatórios, pois se trata de uma matriz complexa. KAWAGUCHI et al., (2008) também utilizaram HF-LMPE para extrair BPA em amostras de urina e obtiveram LOD ainda menores ( 0,2  $\text{ng mL}^{-1}$ ) e uma ótima recuperação em torno de 101%. A técnica de microextração também é muito robusta e eficiente também quando se trata de matrizes ambientais. TAN et al., (2012) extraíram BPA em amostras de água e obtiveram limites de (0,2  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) enquanto que a recuperação obtida foi alta (92,8 - 101,9 %). PINTO et al.,( 2017) determinou cinco ftalatos e BPA em amostras de chorume e obtiveram altos fatores de enriquecimento (376 - 532 %) e uma recuperação muito satisfatória no chorume bruto ( 53 - 89 %), pois considera-se que exista um elevado efeito de matriz para este estudo. Outros trabalhos empregando HF-LPME como técnica de extração estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4. Estudos recentes utilizando HF-LPME para extração e pré-concentração de diferentes analitos e matrizes

Referência	Analito	Matriz	Solvente extrator	Técnica de Análise	LOD
(GHAMARI et al., 2017)	Ácido metil hipúrico	Urina	1-octanol	HPLC-UV	2-3 µg/L
(FERNANDEZ et al., 2016)	Metabólitos de ftalatos e BPA	Urina	1- octanol	GC/MS	0,7- 23,3 µg/L
(LI et al., 2013)	Ftalatos	Suco, vinho e leite		GC/MS	0,006-0,03 ng/mL
(SARAJI et al., 2011)	Narcóticos	Urina e plasma	Acetato de hexila	GC/NPD	5- 8 ng/L
(SUN et al., 2013)	Ftalatos	Água mineral suco e leite	1-octanol	HPLC-UV	0,2- 5 ng/mL
(MANSO et al., 2014)	Drogas ant-inflamatórias	Águas residuais	1-octanol	GC/MS	1,6- 5,6 ng/mL
(HUANG et al., 2012)	Ftalatos	Água mineral, chá, vinho e urina	Xileno	GC/MS	5-100 ng/L

Diante do que foi exposto é possível afirmar que a HF-LPME é uma técnica eficiente para pré-concentração de diferentes analitos e clean up de matrizes com elevado grau de complexidade obtendo altos fatores de enriquecimento (> 100 %) e excelente recuperação (80-120 %).

### 3.8 - Métodos cromatográficos para determinação dos ftalatos e seus metabólitos e o Bisfenol A

A cromatografia é uma técnica bastante versátil e a separação está fundamentada nas diferentes interações dos analitos com a fase estacionária. Em GC a amostra é vaporizada e o analito é conduzido através da coluna cromatográfica por um gás de arraste inerte (He, N<sub>2</sub> ou H<sub>2</sub>). Os analitos separados são conduzidos até o sistema de detecção gerando um sinal resposta. Os sistemas de detecção comumente utilizados em cromatografia gasosa são: Ionização em Chama (*Flame Ionization Detector-FID*) aplicada para maioria dos compostos orgânicos e o Espectrômetro de Massas (*Mass Spectrometry- MS*) SKOOG et al., (2005) HARRIS et al., (2005).

O sistema MS é uma técnica usada para o estudo das massas de átomos, moléculas ou fragmentos de moléculas e, portanto apresenta alta sensibilidade proporcionam boa separação, seletividade e detecção para a análise pretendida. Para obtenção do espectro de massa, as moléculas no estado gasoso ou as espécies dessorvidas a partir de fases condensadas são ionizadas, os íons obtidos são acelerados por um campo elétrico e separados de acordo com a razão entre sua massa e sua carga elétrica,  $m/z$ .

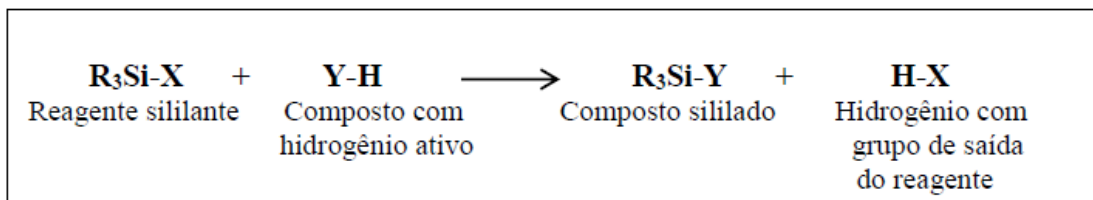
O espectro de massas é um gráfico de abundância relativa (%) versus,  $m/z$ . Portanto, um espectro deste tipo contém as massas de todos os íons identificados pelo detector em um curto intervalo de tempo (*SCAN*) ou pode-se programar o analisador de massas para

monitorar um ou mais valores de m/z no decorrer da separação cromatográfica (*selected ions monitoring* - SIM), este ultimo promove maior seletividade e sensibilidade para a análise cromatográfica, pois apenas os íons de interesse são analisados SKOOG et al., (2005); HARRIS et al.,(2005).

Os PES, MPEs e o BPA podem ser analisados diretamente por cromatografia líquida LI et al., (2015); RAMESH et al., (2016) ou gasosa FERNANDEZ et al., (2016); HERRERO et al., (2015); RASTKARI et al., (2013). A GC/MS é uma técnica que exige a derivatização dos analitos pouco voláteis, o que não é necessário na cromatografia líquida, mas apresenta boa sensibilidade e seletividade, e menor supressão de íons em comparação com a LC/MS.

A etapa de derivatização dos MPEs e do BPA é necessária para gerar derivados mais voláteis, pois ambas as classes de compostos apresentam o grupo funcional -OH em sua estrutura, logo os analitos podem ser adsorvidos e/ou decomporem no injetor produzindo resultados não reprodutíveis (OLIVEIRA et al., 2007).

Dentre as reações de derivatização a sililação se destaca e o reagente derivatizante, BSTFA (N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide) com 1% de TMCS (Trimetilsilil) tem sido aplicado com sucesso neste tipo de reação devido ao seu alto poder de volatilização e de sililação, combinados a estabilidade química e térmica dos analitos. A reação geral está apresentada na figura 12 (POOLE et., 2013).



**Figura 12.** Reação geral de formação do derivado silado. Fonte: (FARAJZADEH et al., 2014)

Este é um processo geralmente simples, normalmente a adição do reagente é o suficiente, quando necessário um aquecimento pode ser empregado para acelerar a reação (POOLE et al., 2013).

## CAPÍTULO IV- Determinação de Metabólitos de Ftalatos e Bisfenol A na urina

### 4.1- Materias e Métodos

#### 4.1.1- Materias e equipamentos

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

#### **4.1.2 - Padrões e soluções**

Os padrões de Monoisononil ftalato (MiNP), Monoetil ftalato (MOP), Monometil ftalato (MMP), Monociclohexyl ftalato (MCHP), Monoisobutil ftalato (MiBP), Monobutil ftalato (MBP), Monoetilhexyl ftalato (MEHP), Monobelzil ftalato (MBzP), Monoetil ftalato (MEP) foram adquiridos da AccuStandard (New Haven, EUA). O Bisfenol A (BPA) e o N-O-Bis-(trimetilsilil) trifluoracetamida (BSFTA) contendo 1% de TMCS foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, EUA).

As soluções estoque dos padrões MiNP, MOP, MMP, MCHP, MiBP, MBP, MEHP, MBzP, MEP, e BPA foram preparadas na concentração de 1000,0 mg L<sup>-1</sup> em acetonitrila grau HPLC da J.T. Baker ( Xalostoc, Edo. De Mex, México). As soluções de trabalho foram preparadas por diluição das soluções estoque em acetonitrila. Todas as soluções foram armazenadas a 4 °C. O solvente extrator utilizado foi uma mistura de octanol:octanoato de etila na proporção 1:1 adquiridos da Sigma-Aldrich (St.Louis,MO,EUA).

#### **4.1.3 - Otimização das condições da extração**

##### ***4.1.3.1- Solvente extrator***

Para otimização do solvente extrator, preparou-se uma solução aquosa dos analitos de interesse na concentração de 40,00 µg L<sup>-1</sup> e a extração foi realizada utilizando octanol, octanoato de etila e uma mistura desses solventes na proporção 1:1. A avaliação da eficiência do solvente extrator foi realizada através das áreas obtidas.

##### ***4.1.3.2 - Planejamento Doehlert***

Em estudo prévio, FERNANDEZ et al., (2016) verificou que o tempo de extração e a rotação são variáveis significativas para o método HF-LPME em relação a todos os compostos estudados neste trabalho, em um intervalo de 95 % de confiança.

Desta forma, um planejamento experimental do tipo Doehlert foi construído e através da função desejabilidade, pode-se estabelecer as condições ótimas para as variáveis. A Tabela 5 descreve os ensaios realizados.

Tabela 5. Matriz experimental da extração dos EDCs com os valores codificados entre parênteses para o planejamento Doehlert

Experimento	Rotação (rpm)	Tempo (min)
E1	1200 (-0,87)*	47,5 (-0,5)*
E2	1200(-0,87)	62,5(+0,5)
E3	2000 (0)	70 (+1,0)
E4	2800(+0,87)	62,5(+0,5)
E5	2800(+0,87)	47,5(-0,5)
E6	2000(0)	40(-1,0)
E7 (C)	2000(0)	55(0)
E8 (C)	2000(0)	55(0)
E9 (C)	2000(0)	55(0)

\*Valores codificados

Por meio das áreas obtidas para cada experimento foi gerada uma superfície de resposta através do programa Statistica versão 8.0 da Statsoft (Tulsa, EUA).

#### 4.1.4 - Preparo de amostra

As amostras de urina foram coletadas de pacientes voluntários na Faculdade de Odontologia-UFMG (44-82 anos) em um frasco coletor, foi retirada uma alíquota de 1mL para realização dos testes de creatinina (kit de dosagem calorimétrico da Labtest) e o restante foi imediatamente transferido para um frasco de vidro, sendo armazenado à -80°C. Todas as coletas foram aprovadas pelo comitê de ética em pesquisa (CEP- UFMG).

O preparo consistiu-se em descongelar a amostra e retirar uma alíquota de 5,00 mL de urina que foi diluída em água ultra pura em um balão de 50,00 mL, logo após uma alíquota de 14,00 mL foi transferida para um frasco de 20,00 mL, adicionou-se 175,00 µL de tampão acetato (2,00 mol L<sup>-1</sup>), ajustou-se o pH entre 6 - 6,5 com hidróxido de amônio (50 % V/V), adicionou-se 25,00 µL da enzima β-glucoronidase (*E.coli*) e processou-se a hidrólise por 90

mim à 37 °C. Em seguida, o pH foi ajustado para 2 com ácido fosfórico (Sigma-Aldrich (St.Louis,MO,EUA)) com o objetivo de desnaturar a enzima e parar a hidrólise. Esse procedimento foi adaptado de FERNANDEZ et al., (2016).

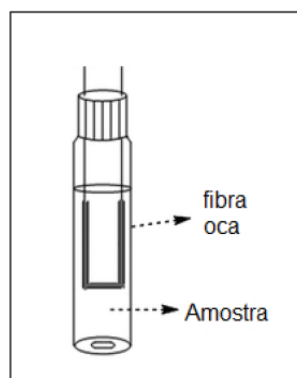
#### 4.1.5 - Método de extração HF-LPME

##### 4.1.5.1- Membrana Porosa

Uma membrana de polipropileno da Accurel PP Q3/2 (Wuppertal, Alemanha) de 600 µm de diâmetro interno, 0,2 µm de tamanho dos poros, e 200 µm de espessura da parede com 70% de porosidade, foi utilizada em todos os ensaios deste trabalho.

##### 4.1.5.2 - Extração otimizada dos analitos

O procedimento HF-LPME consistiu primeiramente no condicionamento da membrana de polipropileno. Para tal, 10,00 cm da fibra foi imersa no solvente de extração por 10 s e o excesso foi retirado por meio da introdução da fibra em uma proveta contendo água, a qual foi sonicada por 10 s. Logo após, 25,00 µL do solvente extrator foi introduzido na fibra com auxílio de uma microseringa, a fibra foi posicionada dentro de um frasco (Fig. 13) contendo 14,00 mL de fase doadora com os analitos de interesse e a extração se processou em 55 min, com agitação de 2000 rpm à temperatura ambiente.



**Figura 13.** Esquema LPME. (adaptado de (Zhang,Hu et al.2013))

#### **4.1.6 - Derivatização**

Após a extração, foi realizada a etapa de derivatização dos analitos, onde 8,00 µL do extrato foi adicionado a 55,00 µL de BSTFA e 6,00 µL de acetonitrila. A mistura foi agitada por 30 s e, em seguida, deixada em repouso por 5 min (FERNANDEZ et al., 2016). Ao final desta etapa, a amostra era analisada por GC/MS.

#### **4.1.7 - Análise Cromatográfica**

##### **4.1.7.1- Instrumentação**

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

##### **4.1.7.2 - Aperfeiçoamento do sistema cromatográfico**

As condições aplicadas no sistema cromatográfico foram aperfeiçoadas a partir dos estudos de FERNANDEZ et al., (2016) e estabeleceu-se um programa de temperatura do forno iniciando a 120 °C, seguido de um aquecimento de 5 °C min<sup>-1</sup> até 190 °C, aquecimento de 15 °C min<sup>-1</sup> até 210 °C, aquecimento de 5 °C min<sup>-1</sup> até 230 °C mantida por 2 min, aquecimento de 30 °C min<sup>-1</sup> até 250 °C mantida por 5 min. O corte do solvente foi fixado em 3 min e o tempo total de corrida foi de 27 min. O gás de arraste utilizado foi hélio (99,999%) com fluxo de 1,3 mL min<sup>-1</sup>. A temperatura do injetor foi programada para 250 °C no modo “splitless” por 1,2 min, seguido por uma taxa de 1:50 “split”. O MS operou no modo de ionização de elétrons (*Electron Ionization-EI*) 70 eV. A temperatura da interface GC/MS foi de 300 °C e temperatura da fonte de íons foi de 230 °C. A análise foi realizada no modo *SegmentScan*. As razões massa/carga (*m/z*) monitoradas foram MMP (89,235,237); MEP (223, 251, 275) MiBP, MBP, MCHP, MEHP, MiNP, MBzP, MOP ( 221, 223, 239, 149), BPA (357, 372, 207).



#### 4.1.8 - Parâmetros de Mérito

Neste estudo os parâmetros de mérito avaliados foram: Seletividade, linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), precisão, e recuperação. Todas as determinações foram realizadas de acordo com o Guia Eurachem 2014 e sob as condições experimentais otimizadas. Foi utilizado como matriz um *pool* obtido pela mistura de volumes iguais de amostras de urina coletadas de 3 homens e 3 mulheres, com idade entre 20 e 53 anos, sem diagnóstico ou evidência de carcinoma de células escamosas de boca. As curvas analíticas matrizadas foram construídas com seis níveis, em triplicata, nas seguintes faixas de concentração: 40,00 - 160,00  $\mu\text{g L}^{-1}$  para os metabólitos MMP e MiNP; 10,00 - 120,00  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o MBP, MCHP e BPA; 30,00 - 160,00  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o MEP; 15,00 - 160,00  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o MiBP; 5,00 - 80,00  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o MEHP; 10,00 - 160,00  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o MOP; 5,00 - 120,00  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o MBzP. O LOD e o LOQ foram determinados pela injeção de dez alíquotas do *pool* de urina branca.

A precisão inter e intra-ensaio foi obtida através da análise de 5 replicatas dos níveis 10,00; 40,00 e 120,00  $\mu\text{g L}^{-1}$  e os resultados foram expressos por meio do coeficiente de variação (CV). O estudo da precisão inter-ensaio foi realizado em dois dias consecutivos. Para a recuperação foram analisadas 10 replicatas do *pool* de urina com adição de padrão na concentração de 80,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , o resultado foi obtido por meio da equação VIII.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{X' - X}{C} * 100 \quad (\text{Equação VIII})$$

onde X' é o valor médio da concentração da amostra enriquecida, X é o valor médio da concentração da amostra sem enriquecimento, e C é a concentração adicionada.

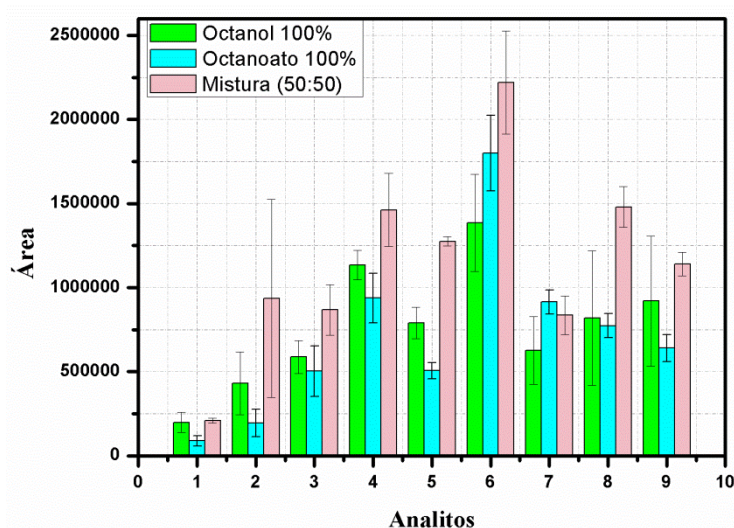
O fator de enriquecimento (F.E) é outro parâmetro comumente usado para demonstrar a eficiência dos processos de extração HF-LPME. Este fator informa o grau de transferência do analito da fase aquosa para a fase orgânica durante a extração, ou seja, quantas vezes o analito pré-concentrou na fase orgânica e foi calculado por meio da equação IV.

## 4.2 - Resultados e Discussões

### 4.2.1 - Otimização das condições da extração

#### 4.2.1.1- Solvente extrator

A escolha do solvente de extração é uma etapa fundamental no método HF-LPME, pois o solvente deve apresentar baixa volatilidade, baixa solubilidade em água e compatibilidade com a fibra de polipropileno utilizada. Os solventes octanol e octanoato de etila foram escolhidos para serem avaliados, pois além de apresentarem as características anteriormente descritas, possuem solubilidade adequada para os analitos de interesse. Dessa forma, foi preparada uma solução aquosa ( $40,00 \mu\text{g L}^{-1}$ ) dos compostos estudados e a extração se processou em 70 min utilizando octanol, octanoato de etila e uma mistura entre estes na proporção 1:1 (v/v). Cada uma das extrações foi realizada em triplicata e os resultados estão expressos por meio de um gráfico de barras (Fig.14).

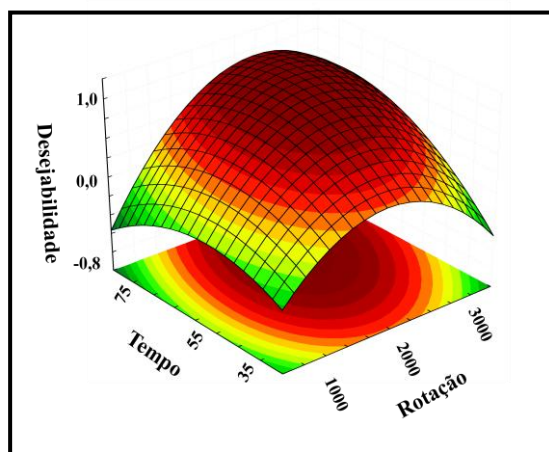


**Figura 14.** Resposta obtida para os analitos (1- MiNP, 2- MOP, 3- MMP, 4- MCHP, 5-MiBP, 6- MEP, 7- MBP, 8- MEHP, 9- MBzP) com diferentes solventes de extração

Pode-se observar por meio dos resultados que a área obtida para a maioria dos analitos foi significativamente maior utilizando a mistura de octanol:octanoato de etila (1:1, v/v) como solvente extrator, este resultado indica que maioria dos analitos de interesse apresenta maior solubilidade na mistura do solventes do que nos mesmos solventes orgânicos em sua forma pura. Logo a mistura de octanol e octanoato de etila (1:1) foi escolhida como o solvente para ser aplicado na extração HF-LPME.

#### 4.2.1.2 - Planejamento Doehlert

No presente trabalho, um planejamento do tipo Doehlert foi realizado a fim otimizar simultaneamente o tempo de extração e rotação, explorando um maior número de níveis e realizando um menor número de experimentos. As múltiplas respostas foram combinadas pela função desejabilidade em uma superfície de resposta (Fig. 15).



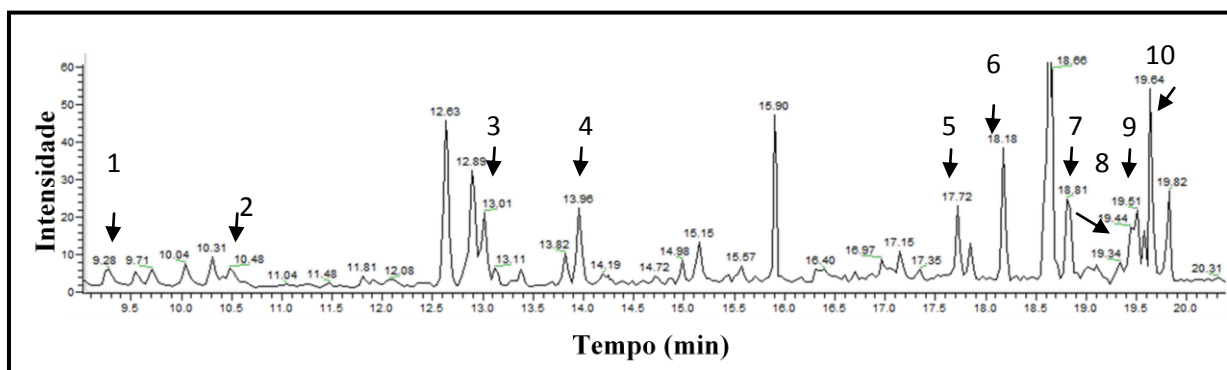
**Figura 15.** Superfície de resposta obtida pelo planejamento Doehlert

A superfície de resposta mostra que os valores próximos de 1 (região escura da superfície) representam as respostas ideais, ou seja, uma extração em um menor tempo possível e aplicação de uma rotação adequada que proporcione a migração dos analitos para fase orgânica sem perda de solvente extrator. Logo projetando o eixo do tempo e o eixo da rotação na área mais escura da superfície obteve-se 55 min e 2000 rpm como condições ótimas para as variáveis tempo de extração e rotação, respectivamente.

#### 4.2.2 - Parâmetros de mérito

##### 4.2.2.1- Seletividade

O método desenvolvido mostrou-se seletivo, ou seja, capaz determinar os componentes de interesse em vista de outros interferentes. O cromatograma apresentado na Figura 16 corrobora essa afirmação.



**Figura 16.** Cromatograma dos compostos estudados (1- MMP; 2-MEP; 3- MiBP ; 4- MBP ; 5- MCHP; 6- MEHP ;7-MiNP; 8-MOP; 9- MBzP; 10- BPA em urina após derivatização por GC/MS, modo Segment Scan

Pode-se observar que o método apresentou boa separação e resolução dos picos em curto tempo de análise (27 min) no modo *segmentscan*.

#### 4.2.2.2 - Faixa Linear, LD e LQ

As curvas lineares foram construídas em seis níveis adicionando padrão em diferentes concentrações na matriz. Os coeficientes de determinação obtidos  $R^2 \geq 0,913$ , mostraram que os ajustes dos modelos de regressão construídos foram adequados. Avaliou-se a variância das respostas experimentais em função da concentração e como essa relação foi proporcional, o método dos mínimos quadrados ponderados foi aplicado (MMQP) para construção das curvas, pois se tratava de resíduos heterocedásticos. O método também apresentou limites de quantificação e detecção baixos, LOQ ( $0,36 - 21,03 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e LOD ( $0,11 - 6,03 \mu\text{g L}^{-1}$ ) para os analitos estudados (Tabela 6).

Tabela 6. Faixa linear, coeficiente de determinação, limites de detecção, limites de quantificação do método proposto para urina

<b>Analito</b>	<b>Faixa Linear</b> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	<b>Equação</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>LOD</b> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	<b>LOQ</b> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
<b>MMP</b>	40-160	$Y=54,33x+0,0086$	0,985	6,03	21,03
<b>MEP</b>	30-160	$Y=128,70x+0,0000021$	0,943	3,79	12,66
<b>MiBP</b>	15-80	$Y=1401,10x-0,0000031$	0,913	0,42	1,41
<b>MBP</b>	20-120	$Y=1243,46x + 0,00000061$	0,975	0,28	0,93
<b>MCHP</b>	5-120	$Y=1280,12x + 0,00522$	0,956	0,29	0,98
<b>MEHP</b>	5-120	$Y=1122,56x - 0,00000099$	0,965	0,35	1,17
<b>MiNP</b>	20-160	$Y=417,65x - 0,0000036$	0,992	0,74	3,11
<b>MOP</b>	10-160	$Y= 664,93x + 0,0000012$	0,953	0,79	2,65
<b>MBzP</b>	5-60	$Y=786,21x + 0,00000023$	0,999	0,11	0,36
<b>BPA</b>	10-120	$Y= 4455,74x + 0,00000029$	0,994	0,22	0,73

Em estudo realizado por HERRERO et al., (2015) para determinação dos analitos MMP, MEP, MBzP, MBP, MiBP, MEHP encontraram limites variando entre: LOD (0,03 - 1,63  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e LOQ (0,10 - 29,60  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), enquanto que FERNANDEZ et al., (2016) encontraram LOQ ( 1,29 - 38,90  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e LOD ( 0,80 - 23,30  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) para o MMP, MiBP, MCHP, MEHP, MBP, BPA, MOP, MiNP e MBzP. Isso mostra que os limites obtidos neste trabalho, estão dentro da faixa já descrita na literatura.

#### **4.2.2.3 - Precisão, Recuperação e Fator de enriquecimento**

Os ensaios de precisão inter e intra dias foram realizados fortificando a matriz em três concentrações diferentes ( 10,00; 40,00 e 120,00  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) pelo mesmo analista e no mesmo equipamento, em dois dias consecutivos, em 5 replicatas de cada concentração. Os CVs encontrados variaram entre 0,75 - 17,35 %, todos abaixo de 20 %, valor recomendado pelo guia de validação Eurachem. Os resultados estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Precisão, recuperação e Fator de enriquecimento (F.E)

Analito	Precisão Intra			Precisão Inter			Recuperação	F.E
	CV			CV			(%)	(%)
	10 ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	40 ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	120 ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	10 ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	40 ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	120 ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	80 ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	
<b>MMP</b>	4,97	6,45	4,82	7,92	8,17	3,13	94	528
<b>MEP</b>	10,15	0,75	4,13	14,31	2,63	4,31	95	532
<b>MiBP</b>	3,25	15,75	17,35	6,05	5,96	5,97	91	510
<b>MBP</b>	3,14	5,10	5,19	2,86	2,69	2,34	96	535
<b>MCHP</b>	8,38	3,72	11,00	4,39	4,67	5,15	75	421
<b>MEHP</b>	6,42	2,82	10,11	5,37	6,88	8,46	80	447
<b>MiNP</b>	11,45	5,95	15,49	17,53	9,17	3,34	102	569
<b>MOP</b>	13,47	7,87	7,02	15,64	8,28	4,74	105	587
<b>MBzP</b>	5,34	7,51	7,03	9,29	5,19	5,49	88	490
<b>BPA</b>	16,23	13,87	7,95	14,88	5,84	15,59	94	526

Como pode ser observado, foram obtidos valores para recuperação acima de 75 %, indicando boa recuperação, segundo o guia de validação Eurachem. Os valores obtidos para F.E foram todos acima de 100 %, valor de referência que indica a eficiência do método HF-LPME em pré-concentrar os analitos para análise em GC/MS.

#### 4.2.3 - Aplicação em amostras reais de urina

##### 4.2.3.1 - Correlação entre amostras de pacientes com CCE e grupo controle

O método desenvolvido foi aplicado em amostras reais de urina de pacientes com diagnóstico comprovado de câncer de células escamosas de boca (CCE). As amostras foram recolhidas de pacientes voluntários com faixa etária entre (44 - 82 anos) sendo 7 mulheres e 9 homens, na Faculdade de Odontologia da UFMG.

As concentrações dos MPEs e BPA foram determinadas nos dois grupos: homens e mulheres com CCE (Grupo estudo) e homens e mulheres sem qualquer evidência da patologia (Grupo controle). Foram excluídos do grupo controle, indivíduos fumantes e apresentavam restaurações dentárias com resinas, recentemente ( menos que 1 mês). Foram analisadas 16 amostras do grupo estudo e 16 amostras do grupo controle, pareando sexo e idade.

Para a comparação dos dois grupos foi necessário considerar a variação diurética de cada paciente logo, foi necessário dividir a concentração de cada analito ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) pela

concentração de creatinina em cada amostra, desta forma os valores encontrados foram expressos em  $\mu\text{g}$  por g de creatinina, na tabela 8.

Tabela 8. Concentração de metabólitos e do bisfenol A no grupo estudo e no grupo controle

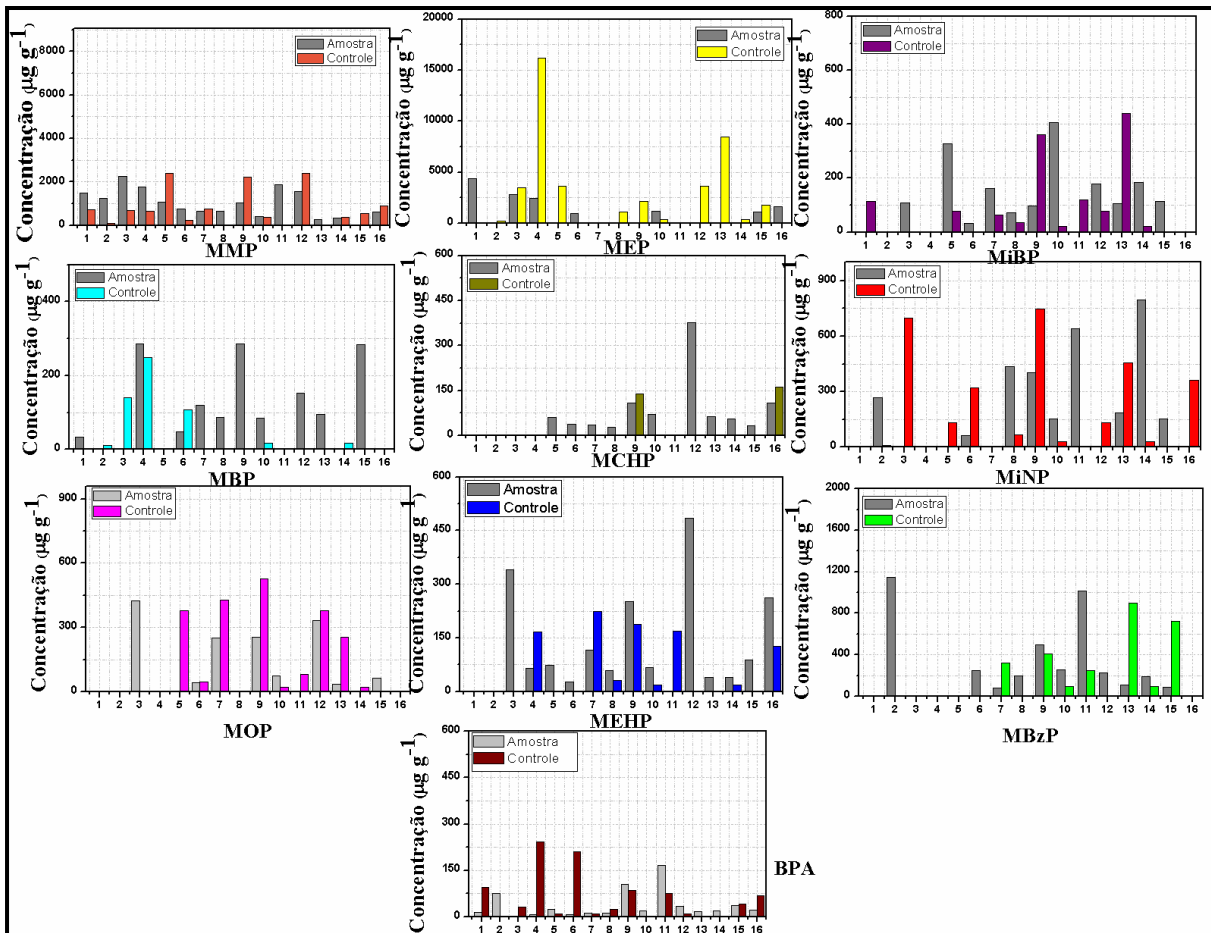
GRUPO ESTUDO ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )										
Amostras	MMP	MEP	MIBP	MBP	MCHP	MEHP	MINP	MOP	MBzP	BPA
1	1469,53	4398,79	-	33,72	-	-	-	-	-	13,38
2	1249,04	-	-	-	-	-	266,45	1144,04	-	75,16
3	2249,95	2799,77	107,51	-	-	340,31	-	-	424,72	-
4	1748,18	2460,42	-	284,95	-	64,75	-	-	-	6,57
5	1066,37	-	328,83	-	60,76	74,27	-	-	-	24,07
6	764,92	919,01	34,03	47,00	37,65	26,60	62,91	250,38	43,63	6,15
7	645,04	-	162,14	119,53	35,60	115,99	-	81,94	251,56	12,07
8	650,71	-	71,99	86,49	28,45	59,05	434,38	200,25	-	12,77
9	1019,31	-	96,26	285,51	109,13	250,78	404,58	494,43	254,37	104,81
10	406,24	1196,90	405,07	84,31	69,94	67,97	153,15	255,49	74,61	19,13
11	1875,48	-	-	-	-	-	639,56	1015,61	-	166,32
12	1570,76	-	177,75	152,38	376,15	486,19	-	229,38	332,97	33,63
13	251,61	-	104,49	94,20	62,74	40,84	184,90	106,98	35,50	16,66
14	322,07	-	183,06	-	54,92	40,63	798,30	187,17	-	18,83
15	-	1068,54	112,85	284,58	33,08	88,16	153,57	87,43	63,26	35,34
16	600,91	1612,82	-	-	110,09	261,83	-	-	-	22,33
GRUPO CONTROLE ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )										
Amostras	MMP	MEP	MIBP	MBP	MCHP	MEHP	MINP	MOP	MBzP	BPA
1C	715,44	-	115,19	-	-	-	-	-	-	94,33
2C	100	230,76	-	10,87	-	-	10,54	-	-	0,97
3C	698,44	3488,34	-	140,31	-	-	699,80	-	-	31,63
4C	639,18	16164,41	-	248,22	-	167,62	-	-	-	243,13
5C	2407,90	3627,36	76,38	-	-	-	132,64	-	377,06	9,17
6C	214,62	-	-	106,83	-	-	322,39	-	47,09	209,79
7C	744,28	-	64,32	-	-	225,29	-	320,26	427,50	9,82
8C	-	1089,70	35,94	-	-	30,74	65,08	-	-	25,28
9C	2212,53	2119,47	360,57	-	139,32	188,41	749,33	411,33	526,65	85,07
10C	355,00	382,09	21,34	17,11	-	18,20	31,31	92,56	23,29	2,74
11C	-	-	119,04	-	-	169,06	-	252,18	82,75	76,04
12C	2407,90	3627,36	76,38	-	-	-	132,64	-	377,06	9,17
13C	-	8440,71	440,38	-	-	-	458,03	895,40	256,25	-
14C	355,00	382,09	21,34	17,11	-	18,20	31,31	92,56	23,29	2,74
15C	541,00	1789,16	-	-	-	-	-	719,49	-	41,50
16C	902,34	-	-	-	162,69	127,66	363,16	-	-	68,51

Aplicou-se o teste de David e foi observado que os dados obedeciam a uma distribuição normal. Para avaliar a presença de *outliers* o teste de Grubbs ( subtraindo da média o menor e o maior valor discrepante do conjunto de dados e dividindo pelo desvio padrão) foi aplicado. Os resultados das análises indicaram a presença de todos os analitos em ambos os grupos. O MMP e o MEP apresentaram maior concentração tanto no grupo estudo ( $322,07 - 2249,95 \mu\text{g g}^{-1}$ ) e ( $919,01 - 4398,79 \mu\text{g g}^{-1}$ ) quanto no grupo controle ( $100,00 - 2407,90 \mu\text{g g}^{-1}$ ) e ( $230,76 - 16164,41 \mu\text{g g}^{-1}$ ), em comparação com os demais analitos estudados enquanto que o BPA foi analito encontrado em menor concentração no grupo

estudo (6,57 - 166,32  $\mu\text{g g}^{-1}$ ), em comparação aos demais. Neste trabalho, devido à técnica de extração utilizada apresentar alta sensibilidade foi possível identificar os MPEs e BPA em faixas mais amplas de concentrações do que em vários estudos já publicados na literatura. KIM et al., (2014) determinaram a concentração de metabólitos em amostras de urina de adultos, por LLE e análise por GC/MS, encontrando uma faixa de concentração para o MEP (0,7- 1149  $\mu\text{g g}^{-1}$ ); MiBP (2,00 - 302,00  $\mu\text{g g}^{-1}$ ); MBzP ( 0,20 - 403,00  $\mu\text{g g}^{-1}$ ); MiNP ( 0,300 - 4,3  $\mu\text{g g}^{-1}$ ); MEHP (0,80 - 94,70  $\mu\text{g g}^{-1}$ ). KONDO et al., (2010) utilizaram extração em fase sólida para “clean up” da amostra e analisaram por GC/MS, os autores encontraram para o MEP (3,06 - 94,40  $\mu\text{g g}^{-1}$ ); MBP (22,80 - 55,00  $\mu\text{g g}^{-1}$ ); MBzP (< LOQ - 39,40  $\mu\text{g g}^{-1}$ ); MEHP (< LOQ - 56, 20  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) e MINP (< LOQ - 6,38). FERNANDEZ et al., (2016) determinou a concentração de BPA em amostras de urina por (HF-LPME-GC/MS) e encontrou uma faixa ( 4,53 - 15,90  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) nas amostras analisadas.

Os dados foram organizados em forma de gráfico de barras como pode ser observado na (Fig.17), e pode ser comparada a concentração de cada analito na amostra e no grupo controle pareando sexo e idade dos 32 indivíduos.



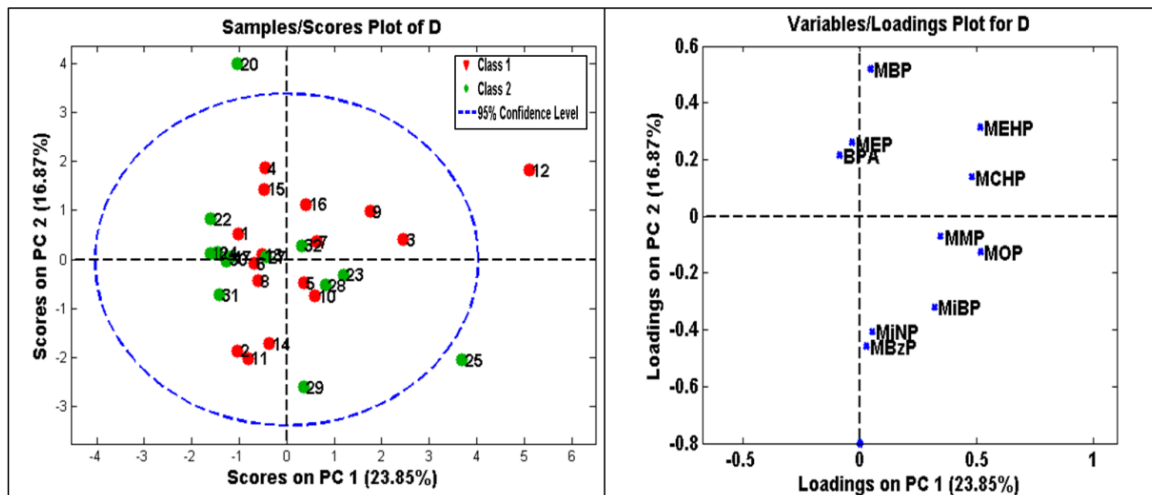


**Figura 17.** Relação entre 16 amostras e 16 controles pareados (sexo e idade), para cada um dos analitos estudados na urina

Por meio da Fig.17 pode se observar que das 16 amostras analisadas 9 apresentavam o MCHP e o MBP em maior concentração do que no grupo controle. O MEHP foi encontrado em maior concentração em 11 das amostras analisadas e o BPA e MBzP foi encontrado em maior concentração na metade das amostras estudadas, em comparação com o grupo controle. Foi possível observar também que, o MMP estava presente na maioria das amostras e o MEP estava presente na metade dos controles e em maior concentração do que no grupo estudo. Este fato sugere alta exposição humana ao DEP.

Uma análise de componentes principais (*Principal Component Analysis -PCA*) foi realizada a 95% de confiança com o software Matalab R2009 ( The MathWorks, Natick, MA, EUA) utilizando o pacote PLS Toolbox (Eigenvector Research, Manson, WA, EUA). Este procedimento consiste em uma manipulação da matriz original dos dados com o intuito de representar as variações presentes em muitas variáveis por meio de um número menor de “fatores”, estes são denominados componentes principais que são construídos pela combinação linear das variáveis originais e devem ser capazes de descrever os dados (FERREIRA et al., 1999). Neste trabalho foi construída uma matriz de 32 linhas e 10

colunas com as concentrações das variáveis nas amostras analisadas. Primeiramente, um autoescalamento foi aplicado como pré-processamento com o objetivo de dar o mesmo peso a todas as variáveis. As variáveis originais foram estudadas em duas classes (grupo estudo e grupo controle) em termos de dois componentes principais (Fig. 18). Os dois primeiros eixos foram escolhidos pois apresentavam a maior variância capaz de explicar os dados (40,72%).



**Figura 18.** Gráfico de scores e loading para as duas classes estudadas: Grupo Estudo (Vermelho) e Grupo Controle (Verde) na urina

Cada linha da matriz é representada por um ponto no gráfico de scores, por meio deste é possível avaliar se ocorreu agrupamento entre as variáveis que estão correlacionadas em um dos dois eixos escolhidos (nova componente), isto é avaliado verificando a separação entre as classes. Desta forma foi possível observar grande dispersão dos dados no gráfico de scores e que consequentemente, não ocorreu separação significativa entre as classes nem em PC1 (explica 23,85 % da variância) nem em PC2 (explica 16,87 % da variância). Isso pode ser explicado devido ao fato que, as variáveis estavam presentes nas duas classes em concentrações próximas, além do que, a baixa variância explicada pode ser atribuída a heterogeneidade dos dados e por estes estarem distribuídos de maneira aleatória no espaço gerado pelas variáveis originais.

No gráfico de loadings é possível avaliar o quanto as variáveis originais contribuem para a separação, ou seja aquelas com maior peso na combinação linear dos dois componentes principais são as mais importantes do ponto de vista estatístico (NETO et al., 1998). Desta forma foi observado que os componentes MBP, MEHP apresentam influencia positiva em PC2, enquanto que MiNP, MBzP, MiBP, MOP, MMP apresentam correlação

negativa em PC2. As variáveis MMP, MOP e MiBP são significativas em PC1 e o BPA e o MEP são pouco representativos na separação tanto em PC1 quanto em PC2.

### 4.3 - Conclusões

O método otimizado neste trabalho permitiu a obtenção das condições ótimas por meio de um planejamento de superfície Doehlert para extração de todos os analitos simultaneamente.

O método aperfeiçoado e validado para a urina permitiu a obtenção de baixos limites (menores do que comparados à alguns trabalhos da literatura) e apresentou bom desempenho para os parâmetros de mérito avaliados: seletividade, linearidade, precisão, recuperação. O método apresentou altos fatores de enriquecimento indicando que a extração HF-LPME foi eficiente para pré- concentrar os analitos em amostras biológicas, tornando-os adequados para serem aplicados na determinação dos compostos em amostras reais.

Todos os analitos foram encontrados nas amostras de urina em concentrações acima de  $6,57 \mu\text{g g}^{-1}$  no grupo estudo e  $2,74 \mu\text{g g}^{-1}$  no grupo controle. Sendo que, para o BPA o máximo encontrado nas amostras foi de  $243,00 \mu\text{g g}^{-1}$ . De acordo com a análise de componentes principais não ocorreu separação significativa entre os dois grupos estudados para a urina, desta forma não foi possível estabelecer uma relação entre a presença dos analitos na urina e a ocorrência de CCE em humanos.

## **CAPÍTULO V- Determinação de Ftalatos, Metabólitos e Bisfenol A na saliva**

### **5.1- Materias e Métodos**

Foram utilizados os matérias e equipamentos listados em **4.1.1**

#### **5.1.1- Padrões e soluções**

Os padrões de Monoisononil ftalato (MiNP), Monoetil ftalato (MOP), Monometil ftalato (MMP), Monociclohexyl ftalato (MCHP), Monoisobutil ftalato (MiBP), Monobutil ftalato (MBP), Monoetilhexyl ftalato (MEHP), Monobelzil ftalato (MBzP), Monoetil ftalato (MEP) foram adquiridos da AccuStandard (New Haven, EUA). O Bisfenol A (BPA), Dimetil ftalato (DMP), Diisononil ftalato (DiNP), Dibutil ftalato (DBP), Dietil ftalato (DEP) e o N-O-Bis-(trimetilsilil) trifluoracetamida (BSFTA) contendo 1% de TMCS foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, EUA).

As soluções estoque dos padrões MiNP, MOP, MMP, MCHP, MiBP, MBP, MEHP, MBzP, MEP, e BPA foram preparadas na concentração de 1000,0 mg L<sup>-1</sup> enquanto que as soluções estoque de DBP, DMP, DEP, DiNP foram preparadas na concentração de 100 mg L<sup>-1</sup> ambos em acetonitrila grau HPLC da J.T. Baker ( Xalostoc, Edo. De Mex, México). As soluções de trabalho foram preparadas por diluição das soluções estoque em acetonitrila. Todas as soluções foram armazenadas a 4 °C. O solvente extrator utilizado foi uma mistura de octanol:octanoato de etila na proporção 1:1 adquiridos da Sigma-Aldrich (St.Louis,MO,EUA).

#### **5.1.2 - Otimização das condições da extração**

##### **5.1.2.1- Solvente extrator**

O solvente extrator otimizado no item **4.1.3.1** foi utilizado.

### **5.1.2.2 - Planejamento Doehlert**

O planejamento experimental do tipo Doehlert do item **4.1.3.2** foi utilizado.

### **5.1.3 - Preparo de amostra**

Foram coletadas cerca de 2mL de saliva não estimulada de pacientes voluntários homens e mulheres, na faculdade de odontologia (UFMG) com faixa etária entre 44-82 anos, armazenadas em um frasco âmbar e congeladas à -80 °C. Todas as coletas foram autorizadas pelo comitê de pesquisa e ética (CEP-UFMG).

O preparo consistiu-se em primeiramente adicionar 1,70 mL de saliva em um eppendorf com 212,00 µL de ácido fósfórico (1,00 mol L<sup>-1</sup>), essa mistura foi centrifugada por 6 min à 140 rpm, com o objetivo de fazer uma limpeza (clean up) da amostra, e melhorar o desempenho da extração. Logo após, o centrifugado foi diluído em um balão de 10,00 mL com água ultra pura. Uma alíquota de 9,00 mL da solução, foi transferida para outro frasco onde ajustou-se o pH entre 6 - 6,5 com hidróxido de amônio (50 % V/V), adicionou-se 8,50 µL da enzima β-glucoronidase (*E.coli*) e processou-se a hidrólise por 90 min à 37 °C. Em seguida, o pH foi ajustado para 2 com ácido fosfórico com o objetivo de desnaturar a enzima e parar a hidrólise. Procedimento adaptado de FERNANDEZ et al., (2016).

### **5.1.4 - Método de extração HF-LPME**

#### **5.1.4.1 - Membrana Porosa**

Uma membrana de polipropileno da Accurel PP Q3/2 (600 µm de diâmetro interno, 0,2 µm de tamanho dos poros e 200 µm de espessura da parede) (Wuppertal, Alemanha) que apresenta 70 % de porosidade, é comumente usada em processos de extração LPME e foi utilizada em todos os ensaios deste trabalho.

#### **5.1.4.2 - Extração otimizada dos analitos**

Foi utilizada uma fibra de LPME de 7,00 cm e o condicionamento foi realizado da mesma forma que descrita em **4.1.5.2**. Após essa etapa, 15,00 µL do solvente extrator foi introduzido na fibra com auxílio de uma microseringa, a fibra foi posicionada dentro de um

frasco contendo 9,00 mL de fase doadora como analitos de interesse e a extração se processou em 55 min, 2000 rpm à temperatura ambiente.

### **5.1.5 - Derivatização**

Após a extração, foi realizada a etapa de derivatização dos analitos: 8,0 µL do extrato foi adicionado a 15,40 µL de BSTFA e 3,00 µL de acetonitrila. A mistura foi agitada por 30 s e, em seguida, deixado em repouso por 5 min (FERNANDEZ et al., 2016). Ao final desta etapa, a amostra foi analisada por GC/MS.

### **5.1.6 - Análise Cromatográfica**

#### **5.1.6.1- Instrumentação**

A mesma instrumentação do item **4.1.7.1** foi utilizada.

#### **5.1.6.2 - Sistema cromatográfico**

Foi estabelecido um programa de temperatura do forno que iniciou à 120 °C, seguido de um aquecimento de 5 °C min<sup>-1</sup> até 190 °C, aquecimento de 15 °C min<sup>-1</sup> até 210 °C, aquecimento de 5 °C min<sup>-1</sup> até 230 °C mantida por 2 min, aquecimento de 30 °C min<sup>-1</sup> até 250 °C mantida por 5 min. O corte do solvente foi fixado em 3 min e o tempo total de corrida foi de 27 min. As demais condições do sistema cromatográfico e do espectrômetro de massas foram estabelecidas como no item **4.1.7.2**. A análise foi realizada no modo *SegmentScan*. As razões massa/carga (m/z) monitoradas foram DMP (163, 133, 77); DEP (149, 150, 177); DiNP (149, 150, 190, 208); DBP (149, 205, 223); MEP (89,235,237); MEP(223, 251, 275), MiBP, MBP, MCHP, MEHP, MiNP, MBzP, MOP (221, 223, 239, 149); BPA (357, 372, 207).

#### **5.1.6.3 - Parâmetros de Mérito**

Da mesma forma que no item **4.1.8** todos os parâmetros (seletividade, linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), precisão, e recuperação) foram avaliados

de acordo com o Guia Eurachem 2014 e sob as condições experimentais otimizadas. Para estes estudos foi utilizado um pool de saliva de 6 homens e 6 mulheres, estudantes da Faculdade de Odontologia da UFMG com idade entre 21-27 anos, sem diagnóstico ou evidência de carcinoma de células escamosas de boca, foram aplicados como fatores de exclusão aqueles indivíduos que apresentavam restaurações recentes com resinas compostas e fumantes. As curvas analíticas matrizadas foram construídas em sete níveis, nas seguintes faixas de concentração: 5,00 - 180,00  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o DMP e MCHP; 40,00 - 180,00  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o MMP e MEP; 1,00 - 180,00  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o DEP e MBP; 5,00 - 120,00  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o DiNP e MiNP; 1,00 - 120,00  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o MiBP, MEHP, MBzP e BPA; 1,00 - 40,00  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o DBP; 5,00 - 80,00  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o MOP. O LOD e o LOQ foram determinados pela injeção de dez alíquotas do *pool* de saliva branca.

A precisão inter e intra-ensaio foi obtida através da análise de 6 replicatas dos níveis 5,00; 40,00 e 180,00  $\mu\text{g L}^{-1}$  e os resultados foram expressos por meio do coeficiente de variação (CV). O estudo da precisão inter-ensaio foi realizado em dois dias consecutivos. Para a recuperação foram analisadas 10 replicatas do *pool* de saliva com adição de padrão na concentração de 40,00  $\mu\text{g L}^{-1}$ , o resultado foi obtido por meio da equação VIII.

## **5.2 - Resultados e Discussões**

### **5.2.1- Otimização das condições da extração**

#### **5.2.1.1 - Solvente extrator**

A otimização do solvente de extração foi descrita no item **4.2.1.1**

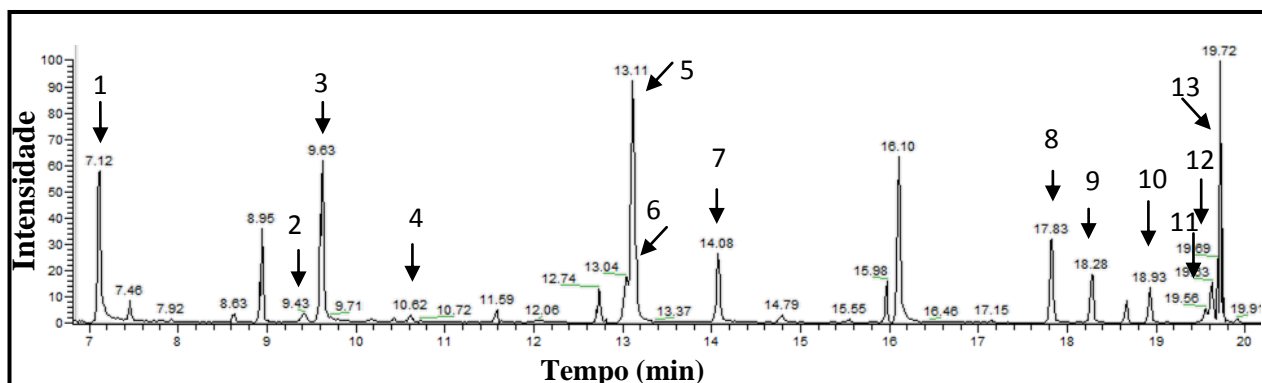
#### **5.2.1.2 - Planejamento Doehlert**

O planejamento Doehlert foi descrito no item **4.2.1.2**

### **5.2.2 - Parâmetros de mérito**

### 5.2.2.1- Seletividade

O método desenvolvido na saliva, apresentou boa seletividade cromatográfica para separação dos componentes de interesse. O cromatograma da separação dos analitos na matriz esta apresentado na Figura 19.



**Figura 19.** Cromatograma dos compostos estudados (1-DMP, 2-MMP,3- DEP, 4-MEP, 5-DiNP,6- MiBP, 7-MBP,8- DBP, 9-MCHP, 10-MEHP, 11-MiNP, 12-MBzP, 13-MOP, 14-BPA) em saliva após derivatização por GC/MS, modo SegmentScan

O método cromatográfico desenvolvido apresentou boa resolução na separação dos analitos em 27 min de corrida no modo *SegmentScan*.

### 5.2.2.2 - Faixa Linear, LOD, LOQ

As curvas lineares foram construídas adicionando padrão em diferentes concentrações na matriz e os coeficientes de determinação obtidos  $R^2 \geq 0,900$ , mostraram que os ajustes dos modelos de regressão construídos foram adequados. Avaliou-se a variância das respostas experimentais em função da concentração e como essa relação foi proporcional, o método dos mínimos quadrados ponderados foi aplicado (MMQP) para construção das curvas, pois se tratava de resíduos heterocedásticos. O método também apresentou limites de quantificação em uma faixa de  $0,09 - 1,78 \mu\text{g L}^{-1}$  e limites de detecção entre  $0,019 - 0,53 \mu\text{g L}^{-1}$  para os analitos estudados (Tabela 9).



Tabela 9. Faixa linear, coeficiente de determinação, limites de detecção, limites de quantificação do método proposto para saliva

Analito	Faixa Linear ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Equação	R <sup>2</sup>	LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
<b>DMP</b>	5-180	Y= 60911,5x - 23377,0	0,988	0,027	0,09
<b>MMP</b>	40-180	Y=4679,1x- 83695,6	0,900	0,19	0,66
<b>DEP</b>	1-180	Y=85031,3x- 78212,1	0,988	0,019	0,07
<b>MEP</b>	40-180	Y=3443,3x- 5,109E-7	0,987	0,24	0,78
<b>DiNP</b>	5-120	165952,6x- 339297,9	0,991	0,21	0,7
<b>MiBP</b>	1-120	Y=35740,3x - 86789,5	0,988	0,06	0,20
<b>MBP</b>	1-180	Y= 54258,7x - 187895,5	0,993	0,18	0,61
<b>DBP</b>	1-40	Y=108409,8x - 118730,4	0,999	0,03	0,11
<b>MCHP</b>	5-180	Y=45585,07x - 53366,8	0,969	0,15	0,5
<b>MEHP</b>	1-120	Y= 37743,3x-101667,17	0,959	0,29	0,98
<b>MiNP</b>	5-120	Y=19958,3x - 23637,6	0,904	0,53	1,78
<b>MOP</b>	1-120	Y=9919,4x - 17206,45	0,993	0,14	0,47
<b>MBzP</b>	5-180	Y=10594,2x +0,00165	0,975	0,18	0,22
<b>BPA</b>	1-120	Y=86916,97x- 151953,9	0,969	0,07	0,24

Em um estudo realizado por SILVA et al., (2005), encontraram para os analitos MEP, MMP, MiBP, MBzP, MEHP e MBP uma faixa de limites de detecção entre 3,10 - 356, 30  $\mu\text{g L}^{-1}$  enquanto que MONTAGNER et al., (2003) encontrou LOD de 3,50  $\mu\text{g L}^{-1}$  e LOQ de 10,00  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o BPA, indicando que o método desenvolvido neste trabalho apresenta maior sensibilidade do que outros já publicados na literatura.

### 5.2.2.3 - Precisão, Recuperação e Fator de enriquecimento (F.E)

Os ensaios de precisão inter e intra dias foram realizados com três níveis de concentração diferentes na matriz fortificada (5,00; 40,00 e 180,00  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) pelo mesmo analista e no mesmo equipamento, em dois dias consecutivos. Os CVs encontrados variaram entre (0,86 - 14,45 %) na precisão intra dia, e entre (1,21 - 18, 68 %) na precisão inter dias todos abaixo de 20 %, valor recomendado pelo guia de validação Eurachem. Os resultados estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Cálculo de precisão intra e inter dias, recuperação e fator de enriquecimento para saliva

Analito	Precisão Intra			Precisão Inter			Recuperação (%)	F.E (%)
	CV			CV				
	5	40	180	5	40	180	40	
	( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	
DMP	5,58	5,88	3,16	4,40	6,95	1,97	87	521
MMP	12,18	6,91	7,00	9,69	8,34	8,35	95	570
DEP	8,60	10,06	14,45	5,70	1,90	3,91	83	502
MEP	11,92	13,15	8,95	7,60	4,65	4,43	118	712
DiNP	3,55	8,99	6,40	2,92	4,52	3,95	101	602
MiBP	11,79	8,17	6,29	10,94	7,09	1,85	90	538
MBP	6,46	4,27	3,88	4,75	2,03	1,43	94	566
DBP	10,25	11,69	4,54	4,19	6,28	1,84	120	719
MCHP	10,56	5,19	3,45	11,08	5,45	1,21	95	571
MEHP	9,96	4,35	6,42	18,69	7,98	2,63	108	649
MiNP	9,66	1,95	5,67	7,99	13,44	3,79	116	700
MOP	0,86	11,68	5,68	2,49	15,18	6,42	84	505
MBzP	9,67	12,71	9,65	5,49	7,87	5,96	97	586
BPA	8,44	7,36	13,02	11,5	12,46	11,14	93	561

Os resultados também mostraram boa recuperação (80 – 120 %) como recomendado pelo guia da Eurachem. O F.E também foi calculado sendo obtido valores acima de 100%, indicando eficiência na pré-concentração dos analitos no método HF-LPME.

### 5.2.3 - Aplicação em amostras reais de saliva

#### 5.2.3.1- Correlação entre amostras de saliva de pacientes com carcinoma de células escamosas (CCE) e grupo controle

Primeiramente, todos os dados obtidos foram submetidos ao Teste de David e foi observado que os dados obedeciam a uma distribuição normal. A presença de *outliers* também foi observada aplicando o Teste de Grubbs. A tabela 11 apresenta as concentrações dos PEs, MPEs e do BPA em  $\mu\text{g L}^{-1}$  dividido em dois grupos: grupo dos pacientes que apresentaram diagnóstico comprovado de CCE (Grupo Estudo) e o grupo dos pacientes que não apresentaram qualquer evidência de CCE ou outra patologia bucal (Grupo Controle).

Tabela 11. Concentração dos metabólitos, ftalatos e o bisfenol A no grupo estudo e no grupo controle na saliva

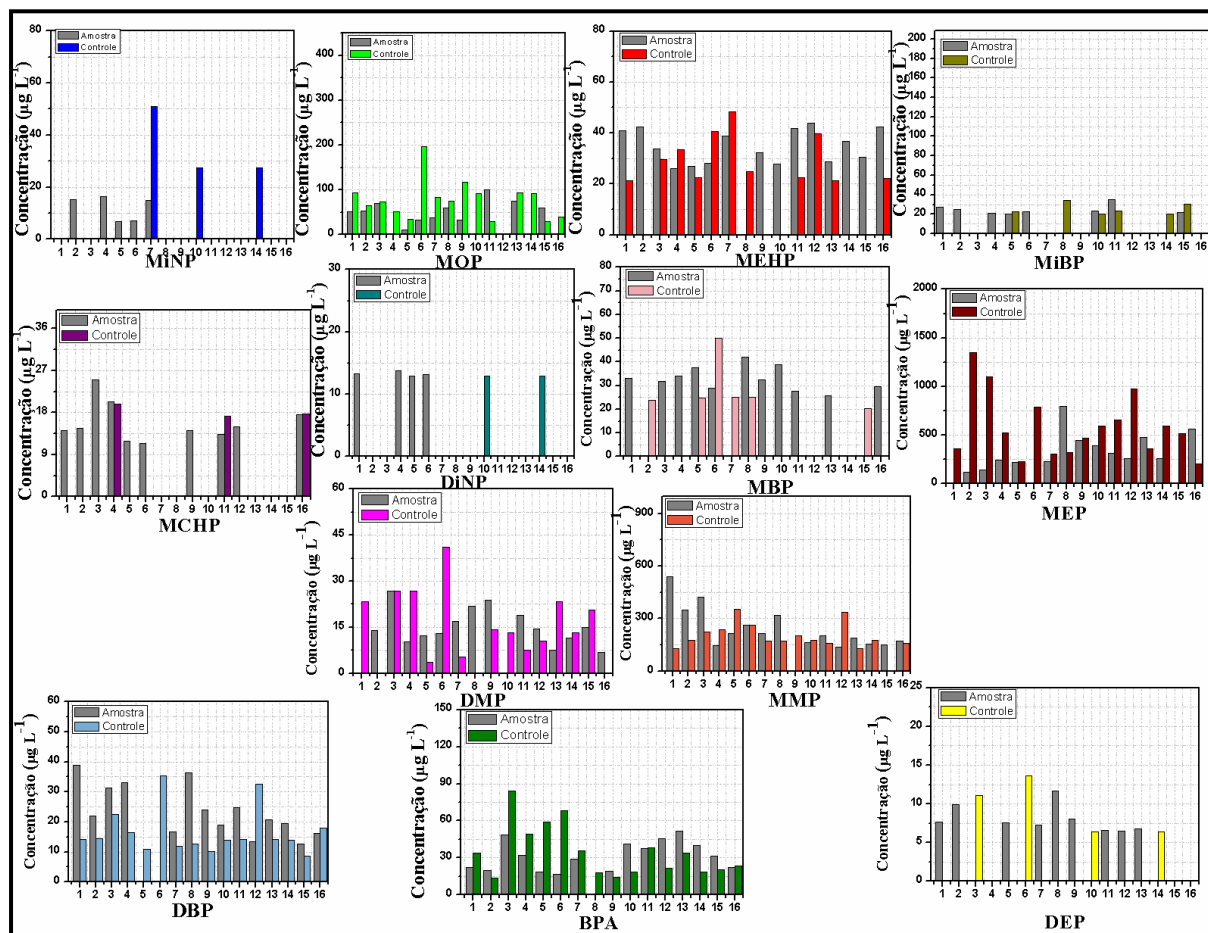
GRUPO ESTUDO ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )														
Amostras	DMP	MMP	DEP	MEP	DINP	MIBP	MBP	DBP	MCHP	MEHP	MINP	MOP	MBzP	BPA
1	-	539,96	7,68	-	13,24	27,37	33,07	38,88	14,13	40,77	-	52,07	-	22,57
2	14,00	348,84	9,93	117,20	-	24,99	-	21,95	14,62	42,28	15,27	52,66	-	19,67
3	26,76	423,09	-	140,59	-	-	31,71	31,33	-	33,83	-	69,16	-	48,34
4	10,42	144,58	-	240,86	13,75	20,79	33,99	33,09	20,37	26,11	16,42	-	-	30,34
5	12,31	214,06	7,61	224,60	12,88	20,52	37,62	-	11,83	26,85	6,86	10,05	-	18,82
6	12,94	260,94	-	-	13,19	22,59	29,05	-	11,40	27,97	6,96	32,74	-	12,77
7	16,85	217,29	7,26	226,01	-	-	-	16,66	-	38,89	15,00	37,17	-	29,21
8	21,95	318,46	11,64	794,01	-	-	42,19	36,44	-	-	-	60,53	-	-
9	23,91	-	8,08	444,67	-	-	32,47	23,90	14,15	32,16	-	32,34	-	19,46
10	-	163,93	-	388,35	-	23,72	38,75	19,05	-	27,87	-	-	-	41,03
11	18,94	202,68	6,62	313,35	-	34,77	27,76	24,86	13,40	41,82	-	100,08	-	37,86
12	14,51	136,21	6,48	257,79	-	-	-	13,36	15,00	43,97	-	-	-	45,79
13	7,70	191,50	6,82	480,89	-	-	25,85	20,84	-	28,79	-	74,88	-	51,92
14	11,52	156,63	-	256,08	-	-	-	19,54	-	36,67	-	-	-	40,23
15	15,07	149,36	-	-	-	22,12	-	12,57	-	30,54	-	59,31	-	31,23
16	6,84	171,43	-	562,08	-	-	29,66	16,23	17,55	42,33	-	-	-	19,27
GRUPO CONTROLE ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )														
Amostras	DMP	MMP	DEP	MEP	DINP	MIBP	MBP	DBP	MCHP	MEHP	MINP	MOP	MBzP	BPA
1C	23,24	129,53	-	363,49	-	-	-	14,29	-	21,31	-	93,37	-	33,97
2C	-	176,89	-	1,351,20	-	-	23,86	14,36	-	-	-	64,33	-	13,52
3C	26,76	221,96	11,11	1,103,53	-	-	-	22,56	-	29,67	-	72,46	-	83,96
4C	26,76	236,10	-	523,95	-	-	-	16,40	19,88	33,36	-	51,71	-	51,00
5C	3,62	354,47	-	226,63	-	22,86	24,84	11,01	-	22,36	-	35,08	-	59,12
6C	40,99	264,78	13,59	788,89	-	-	50,00	35,45	-	40,47	-	196,45	-	68,46
7C	5,47	171,45	-	305,97	-	-	25,22	11,83	-	48,23	50,79	84,04	-	35,62
8C	-	172,19	-	319,02	-	34,23	24,94	12,58	-	24,90	-	74,32	-	18,06
9C	14,35	201,84	-	468,67	-	-	-	10,09	-	-	-	116,56	-	14,17
10C	13,20	178,14	6,44	591,54	12,91	20,39	-	13,86	-	-	27,31	91,96	-	18,72
11C	7,49	160,88	-	655,01	-	23,75	-	14,14	17,32	22,37	-	29,33	-	38,37
12C	10,62	335,69	-	976,13	-	-	-	32,67	-	39,74	-	-	-	21,78
13C	23,24	129,53	-	363,49	-	-	-	14,29	-	21,31	-	93,37	-	33,97
14C	13,20	178,14	6,44	591,54	12,91	20,39	-	13,86	-	-	27,31	91,96	-	18,72
15C	20,57	-	-	520,39	-	30,25	20,27	8,56	-	-	-	29,70	-	20,40
16C	-	160,93	-	204,15	-	-	-	17,95	17,70	22,17	-	39,66	-	26,05

Por meio dos resultados obtidos, foi possível avaliar que os analitos MMP e MEP estavam presentes em altas concentrações em ambos os grupos, em comparação com os demais compostos estudados. A concentração do MMP foi maior no grupo estudo (136,21 - 539,96  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) do que no grupo controle (129,53 - 264,78  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), enquanto que a concentração do MEP foi significativamente maior no grupo controle (204,15 - 1351,20  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) do que no grupo estudo (117,20 - 794,01  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). O DiNP foi encontrado em baixa concentração em ambos os grupos, em comparação com os demais analitos. Foi possível observar que o DiNP (12,91  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), DEP (6,44 - 11,63  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), MiBP (20,39 - 34,23  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), DBP (8,53 - 32,67  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e o MCHP (17,32 - 19,88  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), apresentaram baixas concentrações no grupo controle e altas concentrações no grupo estudo. O MBzP não foi encontrado em nenhuma das amostras analisadas, de ambos os grupos.

Na literatura existem poucos estudos com o propósito de determinar PEs e MPEs na saliva. SILVA et al., (2005) quantificaram alguns MPEs na saliva por SPE e analisaram os

extratos por HPLC-MS/MS, os autores conseguiram quantificar MBP (5,00 - 57,90  $\mu\text{g L}^{-1}$ ); MiBP ( 2,00 - 9,50  $\mu\text{g L}^{-1}$ ); MBzP ( 1,20 - 14,20  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e MEHP (2,00 - 14,90  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Ainda não existem estudos na literatura que tem o objetivo de avaliar a presença de PEs, MPEs e BPA na saliva de pacientes com o tipo de carcinogênese estudada neste trabalho.

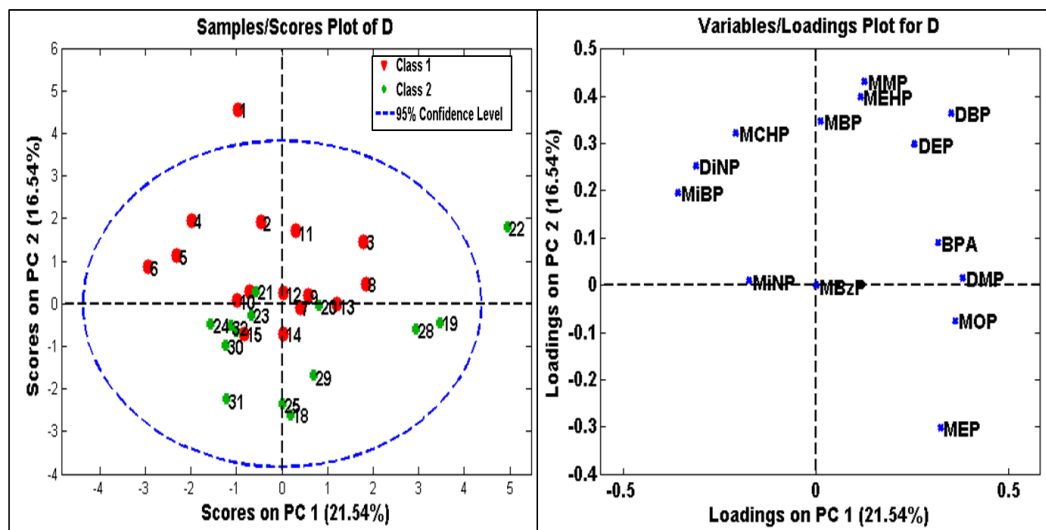
A (Fig.20) relaciona as concentrações do analitos estudados nas 16 amostras do grupo controle e 16 amostras do grupo estudo.



**Figura 20.** Relação entre 16 amostras e 16 controles pareados, para cada um dos analitos estudados na saliva

Por meio da figura anterior observou-se que, os analitos MEHP e o DBP estavam presentes em maior concentração em 12 das 16 amostras estudadas, enquanto que o MBP apresentou maiores concentrações em 10 das 16 amostras, MiBP e o MCHP foram encontrados predominantemente em 7 amostras, o BPA encontrou-se em maiores concentrações em apenas 6 das amostras do grupo estudo. Foi observado também que o MEP, estava presente majoritariamente somente em 3 amostras e o MOP em apenas 2 das 16 analisadas.

Um estudo dos componentes principais (*Principal Component Analysis -PCA*) foi realizado a 95 % de confiança com o software Matlab R2009 ( The MathWorks, Natick, MA, EUA) utilizando o pacote PLS Toolbox (Eigenvector Research, Manson, WA, EUA). As amostras e variáveis estudadas foram organizados em uma matriz de 32 linhas e 14 colunas. Primeiramente os dados passaram por um autoescalamto com o objetivo de dar o mesmo peso para todas as variáveis. Estas foram estudadas em duas classes (grupo estudo e grupo controle). Dois componentes principais que explicam cerca de 38,08 % da variância total foram escolhidos. Os gráficos de score e loading são apresentados na (Fig.21).

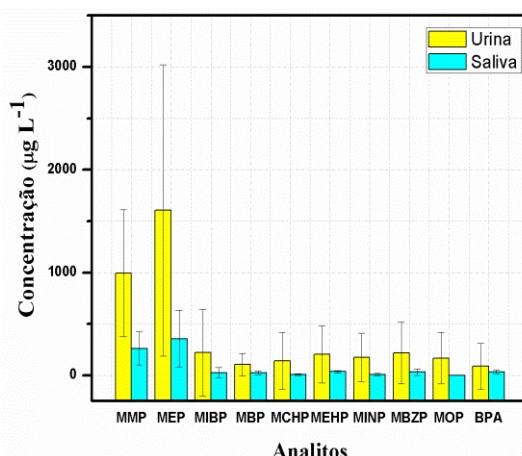


**Figura 21.** Gráfico de escores e loading para as duas classes estudadas :Grupo Estudo (vermelho) e Grupo Controle (verde) na saliva

Por meio da figura 21, pode-se observar que o gráfico de escores obtido para as duas classes estudadas não apresentou uma separação eficiente, mas uma tendência de separação ocorreu na PC2. No gráfico de loadings podemos avaliar quais variáveis estão mais fortemente correlacionadas com a separação das classes estudadas.

Desta forma, as variáveis MEP, MOP, BPA e DMP, DBP tem maior representatividade em PC1 positivamente, enquanto que MMP, MEHP, MBP e DBP, tem maior representatividade em PC2 positivamente, o DBP e DEP tem correlação positiva tanto em PC1 quanto em PC2 e o MBzP não tem representatividade em nenhum dos eixos. È possível afirmar também que as variáveis DiNP e MiBP tem correlação negativa em PC1 ao mesmo tempo que MEP e MOP tem influência negativa em PC2. Uma melhor separação poderá ser obtida de posse de uma maior número de amostras, e poderá ser avaliada em trabalhos futuros.

A Fig. 22 apresenta uma comparação entre as concentrações médias dos analitos estudados na urina e na saliva.



**Figura 22.** Concentração média dos analitos estudados na urina em comparação com os mesmos compostos estudados na saliva

Pode-se observar, que em média todos os analitos apresentaram concentrações em ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) maiores na urina do que na saliva. Estes resultados estão de acordo com os estudos de biomonitoração à exposição de compostos químicos não persistentes como os MPEs e BPA na urina. Por outro lado, os resultados mostram que a saliva também pode ser usada na biomonitoração com a vantagem de ser uma matriz de substituição para o sangue, pois é menos invasiva e de fácil coleta (SILVA, M. J. et al., 2005).

### ***5.2.3.2 - Avaliação de migração de plastificantes para a saliva após tratamento com resina composta***

O objetivo deste estudo foi avaliar a migração de plastificantes para saliva de pacientes que passaram por tratamento dentário com aplicação de resinas compostas (Filtek Z350xt 3M ESPE).

Amostras de saliva foram coletadas antes (no mesmo dia) dos pacientes passarem pelo procedimento e cerca de 15 min após a aplicação da resina. O tempo de 15 min foi escolhido como ideal para que ocorresse a completa migração dos analitos da resina para saliva (MOREIRA et al., 2017). Os resultados estão dispostos na tabela 12.

Tabela 12. Média e desvio padrão das concentrações dos analitos encontrados na saliva antes e depois da aplicação da resina

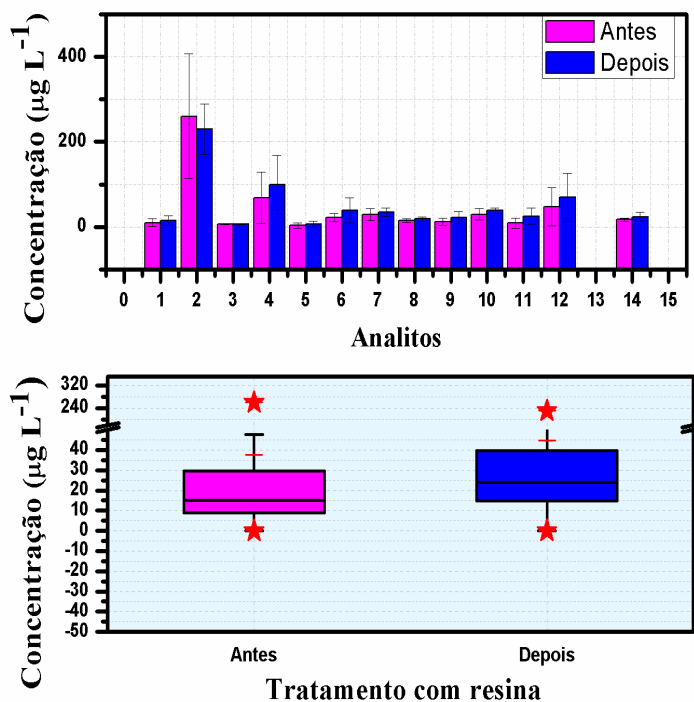
Analitos	Antes ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )		Depois	
	Média	S	Média	S
<b>DMP</b>	9,72	8,98	14,86	11,52
<b>MMP</b>	260,08	147,07	230,45	59,07
<b>DEP</b>	5,94	0,23	6,79	1,73
<b>MEP</b>	68,89	60,66	99,91	68,58
<b>DiNP</b>	3,30	6,10	6,58	7,03
<b>MiBP</b>	22,19	10,23	39,55	29,48
<b>MBP</b>	29,04	14,52	34,53	9,60
<b>DBP</b>	15,02	4,75	18,75	5,25
<b>MCHP</b>	12,79	8,29	22,35	14,44
<b>MEHP</b>	29,54	13,02	38,85	6,40
<b>MiNP</b>	8,91	12,44	25,58	19,31
<b>MOP</b>	47,66	45,24	70,36	56,15
<b>MBzP</b>	-	-	-	-
<b>BPA</b>	17,61	3,50	24,14	10,41

Todos os analitos estudados foram encontrados na saliva dos pacientes antes e depois do tratamento, exceto o MBzP. Observou-se aumento da concentração dos PEs: DMP, DEP, DiNP e DBP e do BPA depois da aplicação da resina. Os metabólitos MMP e MEP foram encontrados em altas concentrações, indicando elevada exposição ao DMP e ao DEP proveniente de diversos fatores externos (ingestão de alimentos contaminados, inalação ou contato dérmico).

Após serem submetidos ao procedimento de aplicação da resina a concentração dos MPEs aumentaram na saliva dos pacientes e essa fato pode ser atribuído a diversas enzimas presentes na saliva que hidrolisam os ftalatos diesters à seus respectivos monoésteres (SILVA, M. J. et al., 2005), logo, embora o método não tenha sido desenvolvido para determinação direta do DiBP (Diisobutil ftalato), DCHP (Dicicloexil ftalato), DEHP (Dietilexil ftalato), DOP (Dioctil ftalato), podemos estimar a presença destes, identificando seu respectivo metabólito na saliva.

A presença de todos os analitos na saliva dos pacientes antes do tratamento dentário, pode ser atribuída a diversos fatores externos, os quais estão sujeitos o ser humano no seu dia-a-dia como a ingestão de alimentos contaminados, inalação e contato dérmico, isso implica que a aplicação de resina não é a única forma de exposição à esse compostos.

A Fig.23 relaciona os dados (antes do tratamento) e (depois do tratamento) em forma de um gráfico de barras para os 14 analitos estudados e em forma de um gráfico de box plot.



**Figura 23.** Gráfico de barras para 1-DMP; 2-MMP; 3-DEP; 4-MEP; 5-DiNP; 6-MiBP; 7-MBP; 8-DBP; 9-MCHP; 10- MEHP; 11- MiNP; 12-MOP; 13-MBzP; 14-BPA e box plot, correlacionando as concentrações dos analitos antes e depois do tratamento com resina

O gráfico box plot acima possibilita melhor interpretação dos resultados. A caixa que representa as concentrações dos analitos depois do tratamento com resina (azul) expressa a média dos resultados em 43,00 µg L<sup>-1</sup> e mediana em 24,00 µg L<sup>-1</sup> a caixa que representa a concentração dos analitos antes do tratamento (rosa) expressa a média dos dados em 40,00 µg L<sup>-1</sup> e mediana em 15,00 µg L<sup>-1</sup>. Os valores em (\*) 260,00 µg L<sup>-1</sup> e 230,00 µg L<sup>-1</sup> indicam os dados discrepantes superiores do tratamento antes e depois com resina, respectivamente. A barra de erro indica o maior e o menor valor não discrepante do conjunto de dados ( 0,00 - 50,00 µg L<sup>-1</sup>) caixa rosa e (0,00 - 70,00 µg L<sup>-1</sup>) para a caixa azul. O gráfico apresentado indicaram que existiu uma migração de plastificantes da resina para saliva entretanto para saber se esta diferença foi ou não significativa aplicou-se o Teste T de Student.

A tabela 13 dispõe do teste T de Student aplicado para os dados antes e depois do tratamento com resina, considerando variância diferente a 95 % de confiança.

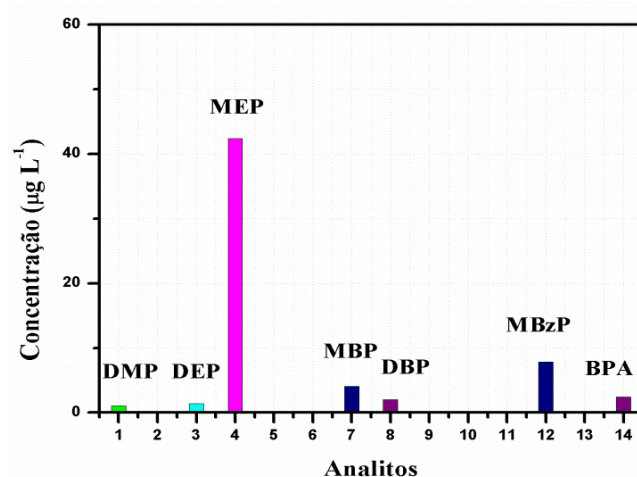


Tabela 13. Teste T de Student para os analitos estudados presumindo variâncias diferentes

Teste t- presumindo variâncias diferentes		
Analitos	t <sub>cal</sub>	t <sub>critico</sub>
DMP	-0,9955793	2,16036865
MMP	0,52872825	2,26215716
DEP	-1,27	2,14478668
MEP	-0,958115	2,14478668
DINP	-0,9961703	2,14478668
MIBP	-1,5732771	2,14478668
MBP	-0,8924919	2,14478668
DBP	-1,4897649	2,14478668
MCHP	-1,6242458	2,20098516
MEHP	-1,8168555	2,22813884
MINP	-2,0527686	2,17881283
MOP	-0,8902947	2,16036865
BPA	-1,6816216	2,14478668

Os resultados dos testes estatísticos mostraram que não existe diferença significativa entre os dados apresentados.

Com o objetivo de encontrar os PEs que migram de resinas compostas tentando eliminar os fatores externos de exposição, foi realizada uma extração durante 55 min com uma resina (MasterFill, A3,5) em que uma parte desta foi colocada em frasco de vidro contendo 14,00 mL de água ultra pura e os resultados são apresentados na Fig.24.



**Figura 24.** Extração dos analitos de uma resina composta em meio aquoso

Pode-se observar que o DMP, DEP, MEP, MBP, DBP, MBzP e BPA foram identificados na extração.

Diversos estudos identificaram a migração do BPA de resinas à base de BIS-GMA ou BIS-DMA, *in vivo* e *in vitro*. MOREIRA et al., (2017) encontraram 1,82 ng g<sup>-1</sup> de BPA na

saliva humana até 30 min após exposição com a resina. MONTAGNER et al., (2003) encontraram até 72,30 ng mL<sup>-1</sup> na saliva humana, logo após o procedimento dentário.

Existem relatos na literatura que identificaram a presença de PEs em resinas acrílicas (metil metacrilato e polimetilmetacrilato) LYGRE et al., (1993); SOFOU et al., (2005), entretanto ainda não existem estudos que identificaram a presença de PEs em resinas compostas. Da mesma forma, também não há estudos que comprovam que diésteres sofrem hidrólise em água ultra pura. Logo a presença do MEP, MBP e MBzP pode ser explicada devido a alguma contaminação externa, possivelmente da água utilizada no procedimento, logo uma investigação mais detalhada pode ser feita em trabalhos futuros.

### 5.3 - Conclusões

O método desenvolvido e validado para a saliva permitiu a obtenção de baixos limites (menores do que comparados à alguns trabalhos da literatura) e apresentou bom desempenho para os parâmetros de mérito avaliados: seletividade, linearidade, precisão, recuperação. O método apresentou altos fatores de enriquecimento indicando que a extração HF-LPME foi eficiente para pré - concentrar os analitos em amostras biológicas, tornando-os adequados para serem aplicados na determinação dos compostos em amostras reais.

Somente o MBzP não foi encontrado em nenhuma amostra de saliva, os demais analitos foram encontrados no grupo estudo e grupo controle acima de 6,48 µg L<sup>-1</sup> e 5,47 µg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

De acordo com a análise de componentes principais, uma tendência de separação entre as classes estudadas ocorreu em PC2 para na saliva e que os analitos MMP, MEHP, MBP, MCHP e DBP apresentaram influencia positiva nesse separação. Este fato pode ser explicado devido a saliva ser uma matriz menos complexa que apresenta menos interferentes à análise pretendida. Logo pode existir uma relação entre a presença dos plastificantes na saliva e a ocorrência de CCE em humanos, entretanto um estudo mais detalhado com uma maior número de amostra deve ser realizado futuramente.

Avaliou-se a migração de plastificantes de resinas compostas para a saliva de pacientes que foram expostos ao material e foi possível concluir que apesar de não ser estatisticamente significativa a migração ocorreu.

## Capítulo VI - Conclusões gerais

De modo geral é possível afirmar que os métodos desenvolvidos, aperfeiçoados e validados foram eficientes para pré-concentração e determinação de plastificantes em fluidos biológicos, utilizando pouco solvente e de forma rápida (comparado a técnicas tradicionais de extração). Mostrando ampla aplicabilidade para controle de exposição destes componentes tóxicos à população humana.

Não foi possível correlacionar a presença dos analitos na urina e a ocorrência de CCE em humanos, mas para os estudos na saliva, concluiu-se que pode existir uma tendência para essa associação, entretanto um estudo mais completo deve ser realizado, para obter uma posição final.

## Capítulo VII - Referências

ACEVEDO, N. et al. Perinatally administered bisphenol a as a potential mammary gland carcinogen in rats. **Environmental health perspectives**, v. 121, n. 9, p. 1040, 2013.

AEKPLAKORN, W. et al. Relationship of serum bisphenol A with diabetes in the Thai population, National Health Examination Survey IV, 2009. **Journal of diabetes**, v. 7, n. 2, p. 240-249, 2015.

ALSHARIF, A. et al. Efficiency of Hollow Fiber Liquid-Phase Microextraction Chromatography Methods in the Separation of Organic Compounds: A Review. **Journal of Chromatographic Science**, 2016.

ANDERSON, W. et al. A biomarker approach to measuring human dietary exposure to certain phthalate diesters. **Food Additives & Contaminants**, v. 18, n. 12, p. 1068-1074, 2001.

ADDICTIVES, FDA. Indirect food additives: adhesives and components of coatings. **Final Rule Food and Drug Administration**, v. 78, 2013.

ANVISA. Dispõe sobre Regulamento Técnico sobre Lista Positiva de Aditivos para Materiais Plásticos destinados à Elaboração de Embalagens e Equipamentos em Contato com Alimentos. **Diário Oficial Da União**, p. 1-49, 2008.

ANVISA. Monômeros, outras substâncias iniciadoras e polímeros plásticos em contato com alimentos. **Resolução da Diretoria Colegiada**, v. RDC no 56, n. D, 2012.

BANEGAS, R. et al. **Estudos em filmes formados por PVC e agentes plastificantes: estabilidade, morfologia, propriedades térmicas e mecânicas**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2011.

BERNARDO, P. et al.. Bisfenol A: o uso em embalagens para alimentos, exposição e toxicidade—Uma Revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 74, n. 1, p. 1-11, 2015.

BHANDARI, R. et al. Urinary bisphenol A and obesity in US children. **American journal of epidemiology**, v. 177, n. 11, p. 1263-1270, 2013.

BILA, D. et al. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química nova**, v. 30, n. 3, p. 651, 2007.

BIRKETT, J. et al. **Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment processes**. IWA Publishing, 2002. ISBN 1843390310.

BLOUNT, B. et al. Quantitative detection of eight phthalate metabolites in human urine using HPLC–APCI-MS/MS. **Analytical chemistry**, v. 72, n. 17, p. 4127-4134, 2000.

BRASIL. **Decreto n.º 13/2007**, de 18 de jan.2007. Brasília, DF, jan 2007.

Disponível em:

<<https://dre.tretas.org/dre/205103/decreto-lei-13-2007-de-19-de-janeiro>. Acesso em 2017-11-11.

BRASIL. **Lei 12.305 PNRS**, de 02 de agosto de 2010. Brasília, DF, ago 2010. Atualizada em 18/5/2012. Disponível em <<http://www.portalresiduossolidos.com/lei-12-3052010-politica-nacional-de-residuos-solidos/>> . Acesso em 2018-01-17

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

CAO, X. et al. Phthalate esters in foods: sources, occurrence, and analytical methods. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 9, n. 1, p. 21-43, 2010.

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

CARSON, R. et al. **Silent Spring. Greenwich, Connecticut**: Fawcett Publications 1962.

CASERTA, D. et al. Correlation of endocrine disrupting chemicals serum levels and white blood cells gene expression of nuclear receptors in a population of infertile women. **International journal of endocrinology**, v. 2013, 2013.

CHANG, Y. et al. Regulation of estrogen receptor  $\alpha$  function in oral squamous cell carcinoma cells by FAK signaling. **Endocrine-related cancer**, v. 21, n. 4, p. 555-565, 2014.

CHEVRIER, C. et al. Maternal urinary phthalates and phenols and male genital anomalies. **Epidemiology (Cambridge, Mass.)**, v. 23, n. 2, p. 353, 2012.

CHIMUKA, L. et al. Influence of temperature on mass transfer in an incomplete trapping supported liquid membrane extraction of triazole fungicides. **Journal of separation science**, v. 32, n. 7, p. 1043-1050, 2009.

CHOU, K. et al. Phthalates in food and medical devices. **Journal of Medical Toxicology**, v. 2, n. 3, p. 126-135, 2006.

COLELLA, G. et al. Expression of sexual hormones receptors in oral squamous cell carcinoma. **International journal of immunopathology and pharmacology**, v. 24, n. 2\_suppl, p. 129-132, 2011.

DE OLIVEIRA, R. et al. Recent advances in chromatographic methods to detect drugs of abuse in alternative biological matrices. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 3, n. 2, p. 95-109, 2007.

DE SOUZA, F. **Processos eletro-oxidativos aplicados à degradação de dimetil ftalato**. 2013. Tese (Doutorado em Físico-Química)- Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013. Doi: 10,11606/T.75.2013.tde-30072013-092845. Acesso em: 2018-01-17

DEKANT, W. et al. Human exposure to bisphenol A by biomonitoring: methods, results and assessment of environmental exposures. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 228, n. 1, p. 114-134, 2008.

DESDOITS-LETHIMONIER, C. et al. Human testis steroidogenesis is inhibited by phthalates. **Human Reproduction**, 2012.

DEWALQUE, L. et al. 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**, v. 949-950, p. 37-47, Feb 15 2014.

DI DONATO, M. et al. Recent advances on bisphenol-A and endocrine disruptor effects on human prostate cancer. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 2017.

DODSON, R. et al. Endocrine disruptors and asthma-associated chemicals in consumer products. **Environmental health perspectives**, v. 120, n. 7, p. 935, 2012.

MAGALHÃES, IR dos S. et al. Fundamentos e avanços recentes da microextração em fase líquida empregando membranas cilíndricas ocas (LPME). **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 4, p. 11-17, 2009.

ELIAS, R. et al. Efeitos do Bisfenol A (BPA) na infertilidade masculina e feminina–revisão literária. **Atas de Saúde Ambiental-ASA (ISSN 2357-7614)**, v. 3, n. 2, p. 119-124, 2016.

EPA, U. Environmental Protection Agency: Integrated Risk Information System (IRIS) on Di (2-ethylhexyl) phthalate. **National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, Washington, DC**, 1999.

FARAJZADEH, M. et al. Derivatization and microextraction methods for determination of organic compounds by gas chromatography. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 55, p. 14-23, 2014.

FASANO, E. et al. Migration of phthalates, alkylphenols, bisphenol A and di (2-ethylhexyl) adipate from food packaging. **Food Control**, v. 27, n. 1, p. 132-138, 2012.

FENG, C et al. 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**, v. 177, n. 1-2, p. 167-175, 2012.

FERNANDEZ, M. et al. Hollow fiber liquid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry method to analyze bisphenol A and other plasticizer metabolites. **Journal Chromatography A**, v. 1481, p. 31-36, Jan 20 2016.

FERREIRA, M. et al. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p. 724-731, 1999.

FONTENELE, E. et al. Contaminantes ambientais e os interferentes endócrinos. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 54, n. 1, p. 6-16, 2010.

FREDERIKSEN, H et al. 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**, v. 34, n. 7, p. 400-410, 2010.

GAO, D. et al. Phthalate esters in the environment: a critical review of their occurrence, biodegradation, and removal during wastewater treatment processes. **Science of The Total Environment**, v. 541, p. 986-1001, 2016.

GHAMARI, F. et al. Hollow-fiber liquid-phase microextraction based on carrier-mediated transport for determination of urinary methyl hippuric acids. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 99, p. 760-771, 2017

GHISELLI, G. et al. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química nova**, v. 30, n. 3, p. 695, 2007.

GOLOUBKOVA, T. et al. Xenoestrogênios: o exemplo do bisfenol-A. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 44, n. 4, p. 323-330, 2000.

GORE, A. et al. Introduction to endocrine disrupting chemicals (EDCs)—a guide for public interest organizations and policy makers. **Endocrine society reports and white papers**, p. 1-76, 2014.

GREEN, G. et al. Chromatographic fractionation and analysis by mass spectrometry of conjugated metabolites of bis (2-ethylhexyl) phthalate in urine. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 677, n. 1, p. 99-109, 1996.

HARLEY, K. et al. Prenatal and early childhood bisphenol A concentrations and behavior in school-aged children. **Environmental research**, v. 126, p. 43-50, 2013.

HARRIS, Daniel. C. **Análise Química Quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S.A. 2005.

HATCH, E. et al. Association of urinary phthalate metabolite concentrations with body mass index and waist circumference: a cross-sectional study of NHANES data, 1999–2002. **Environmental Health**, v. 7, n. 1, p. 27, 2008.

HEINDEL, J. et al. Endocrine disruptors and obesity. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 11, n. 11, p. 653-661, 2015.

HERRERO, L. et al. Feasibility of ultra-high performance liquid and gas chromatography coupled to mass spectrometry for accurate determination of primary and secondary phthalate metabolites in urine samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 853, p. 625-36, Jan 01 2015.

HEUDORF, U. et al. Phthalates: toxicology and exposure. **International journal of hygiene and environmental health**, v. 210, n. 5, p. 623-634, 2007.

HO, T. et al. Liquid-phase microextraction of protein-bound drugs under non-equilibrium conditions. **Analyst**, v. 127, n. 5, p. 608-613, 2002.

HOFFMANN, S. et al Revisão sistemática sobre implicações do uso de embalagens com bisfenol a–bpa para a saúde humana. **Revista Caderno Pedagógico**, v. 13, n. 3, 2016.

HOLM, A. et al. 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**, v. 378, n. 7, p. 1762-1768, 2004.

HUANG, T. et al. Gender and racial/ethnic differences in the associations of urinary phthalate metabolites with markers of diabetes risk: national health and nutrition examination survey 2001–2008. **Environmental Health**, v. 13, n. 1, p. 1, 2014.

HUANG, G. et al. Vortex solvent bar microextraction for phthalate esters from aqueous matrices. **Talanta**, v. 100, p. 64-70, 2012

HUFF, J. et al. Carcinogenicity of bisphenol-A in Fischer rats and B6C3F1 mice. **Odontology**, v. 89, n. 1, p. 0012-0020, 2001.

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

JAAKKOLA, J. et al. The role of exposure to phthalates from polyvinyl chloride products in the development of asthma and allergies: a systematic review and meta-analysis. **Environmental health perspectives**, v. 116, n. 7, p. 845, 2008.

JAMES-TODD, T. et al. Pregnancy urinary phthalate metabolite concentrations and gestational diabetes risk factors. **Environment International**, v. 96, p. 118-126, 2016.

JOENSEN, U. et al. Phthalate excretion pattern and testicular function: a study of 881 healthy Danish men. **Environmental health perspectives**, v. 120, n. 10, p. 1397, 2012.

- JOSKOW, R. et al. Exposure to bisphenol A from bis-glycidyl dimethacrylate-based dental sealants. **The Journal of the American Dental Association**, v. 137, n. 3, p. 353-362, 2006.
- JUNG, H. et al. The association between some endocrine disruptors in human plasma and the occurrence of congenital hypothyroidism. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 35, n.2, p. 278-283, 2013.
- KABIR, E. et al. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 40, n. 1, p. 241-258, 2015.
- KAWAGUCHI, M. et al. Miniaturized hollow fiber assisted liquid-phase microextraction with in situ derivatization and gas chromatography-mass spectrometry for analysis of bisphenol A in human urine sample. **Journal of Chromatography B**, v. 870, n. 1, p. 98-102, 2008.
- KIM, C. et al. Distribution of bisphenol A in the neuroendocrine organs of female rats. **Toxicology and industrial health**, v. 20, n. 1-5, p. 41-50, 2004.
- KIM, J. et al. Comparative study of thermal desorption and solvent extraction-gas chromatography-mass spectrometric analysis for the quantification of phthalates in polymers. **Journal of Chromatography A**, v. 1451, p. 33-40, 2016.
- KIM, K. et al. Association between urinary concentrations of bisphenol A and type 2 diabetes in Korean adults: a population-based cross-sectional study. **International journal of hygiene and environmental health**, v. 216, n. 4, p. 467-471, 2013.
- KIM, M. et al. Simultaneous analysis of urinary phthalate metabolites of residents in Korea using isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry. **Science of the Total Environment**, v. 470-471, p. 1408-13, Feb 01 2014.
- KINGMAN, A. et al. Bisphenol A and other compounds in human saliva and urine associated with the placement of composite restorations. **The Journal of the American Dental Association**, v. 143, n. 12, p. 1292-1302, 2012.
- KONDO, F. et al. Determination of five phthalate monoesters in human urine using gas chromatography-mass spectrometry. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 85, n. 1, p. 92-6, Jul 2010.
- KUMAR, A. et al. Analytical methods for the determination of biomarkers of exposure to phthalates in human urine samples. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**. v. 75, p. 151-161, 2016.
- LAPINSKAS, P. J. et al. Role of PPAR $\alpha$  in mediating the effects of phthalates and metabolites in the liver. **Toxicology**, v. 207, n. 1, p. 149-163, 2005.
- LI, D. et al. Urine bisphenol-A level in relation to obesity and overweight in school-age children. **PloS one**, v. 8, n. 6, 2013.
- LI, X. et al. Improvement of bisphenol A quantitation from urine by LCMS. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 407, n. 13, p. 3869-3874, 2015.



LINHARES JUNIOR, G. et al. **Desenvolvimento e validação de metodologia cromatográfica para determinação de bisfenol A em simulantes de alimentos de ensaios de migração**.2012. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Fortaleza-CE, 2012. Disponível em <<http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/17524>>

LOMENICK, J. et al. Phthalate exposure and precocious puberty in females. **The Journal of pediatrics**, v. 156, n. 2, p. 221-225, 2010.

LÓPEZ-CARRILLO, L. et al. Exposure to phthalates and breast cancer risk in northern Mexico. **Environmental health perspectives**, v. 118, n. 4, p. 539, 2010.

LOPEZ, A. et al. Toxicidade de Disruptores Endócrinos Sintéticos Manipulados em Odontologia. **PORANDU-Revista de Divulgação Científica em Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 1, n. 1, p. 63-77, 2015.

LORBER, M. et al. Exposure assessment of adult intake of bisphenol A (BPA) with emphasis on canned food dietary exposures. **Environment international**, v. 77, p. 55-62, 2015.

LOUREIRO, I. et al. **A importância e ocorrência de ftalatos em água potável e no ecossistema da Baía de Guanabara**.2002. Tese de Doutorado (Doutorado em química analítica), Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica, Rio de Janeiro, 2002.

LYGRE, H. et al. Leaching of organic additives from dentures in vivo. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 51, n. 1, p. 45-51, 1993.

MAMTANI, M. et al. Association of Urinary Phthalates with Self-Reported Eye Affliction/Retinopathy in Individuals with Diabetes: National Health and Nutrition Examination Survey, 2001-2010. **Journal of diabetes research** , v. 2016, p. 7269896, 2016.

MANSO, J. et al. Determination of 4'-isobutylacetophenone and other transformation products of anti-inflammatory drugs in water and sludge from five wastewater treatment plants in Sweden by hollow fiber liquid phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. **Talanta**, v. 125, p. 87-93, 2014.

MEEKER, J. et al. Di (2-ethylhexyl) phthalate metabolites may alter thyroid hormone levels in men. **Environmental health perspectives**, p. 1029-1034, 2007.

MELZER, D. et al. Association of urinary bisphenol a concentration with heart disease: evidence from NHANES 2003/06. **PloS one**, v. 5, n. 1, 2010.

MICHAŁOWICZ, J. et al. Bisphenol A—sources, toxicity and biotransformation. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 37, n. 2, p. 738-758, 2014.

MICHEL, M. et al. Influence of temperature on mass transfer in an incomplete trapping single hollow fibre supported liquid membrane extraction of triazole fungicides. **Analytica chimica acta**, v. 632, n. 1, p. 86-92, 2009.

MONTAGNER, T. et al. **Desenvolvimento e validação de método de análise de bisfenol A em amostras de saliva humana por GG-EM.** Dissertação (Mestrado em Química)-Instituto de Química, Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2003.

MOREIRA, M. et al. **Desenvolvimento de métodos cromatográficos para análise de plastificantes, alquilfenóis e seus metabólitos em alimentos e urina.** Tese Doutorado (Doutorado em Química Analítica)- Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014. Disponível em <<http://hdl.handle.net/1843/SFSA-9U8T2F>>. Acesso em 2018-01-17

MOREIRA, M. et al. Bisphenol A release from orthodontic adhesives measured in vitro and in vivo with gas chromatography. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 151, n. 3, p. 477-483, 2017.

NETO, J. et al. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química nova**, v. 21, n. 4, p. 467-469, 1998.

OLIVEIRA, A. et al. Microextração em fase líquida (LPME): fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 637-644, 2008.

OSTROVSKÝ, I. et al. Determination of phthalate sum in fatty food by gas chromatography. **Food Chemistry**, v. 124, n. 1, p. 392-395, 2011.

PEDERSEN-BJERGAARD, S. et al. Liquid- liquid- liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis. **Analytical chemistry**, v. 71, n. 14, p. 2650-2656, 1999.

PINTO, I. et al. **Desenvolvimento e validação de metodologia para determinação de bisfenol A e ftalatos em amostras de chorume por GC-MS.**Dissertação (Mestrado em Química Analítica)-Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017.

POOLE, C. et al. Alkylsilyl derivatives for gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1296, p. 2-14, 2013.

RAMESH KUMAR, A. et al. Analytical methods for the determination of biomarkers of exposure to phthalates in human urine samples. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 75, p. 151-161, 2016.

RASMUSSEN, K. et al. Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 1, p. 1-10, 2004.

RASTKARI, N. et al. Magnetic solid-phase extraction based on magnetic multi-walled carbon nanotubes for the determination of phthalate monoesters in urine samples. **J Chromatogr A**, v. 1286, p. 22-8, Apr 19 2013.

REZG, R. et al. Bisphenol A and human chronic diseases: current evidences, possible mechanisms, and future perspectives. **Environment international**, v. 64, p. 83-90, 2014.

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

ROGERS, J. et al. Endocrine disrupting chemicals and immune responses: a focus on bisphenol-A and its potential mechanisms. **Molecular immunology**, v. 53, n. 4, p. 421-430, 2013.

ROZATI, R. et al. Role of environmental estrogens in the deterioration of male factor fertility. **Fertility and sterility**, v. 78, n. 6, p. 1187-1194, 2002.

RUSYN, I. et al. Mechanistic considerations for human relevance of cancer hazard of di (2-ethylhexyl) phthalate. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 750, n. 2, p. 141-158, 2012.

SAMANDAR, E. et al. Temporal stability of eight phthalate metabolites and their glucuronide conjugates in human urine. **Environmental research**, v. 109, n. 5, p. 641-646, 2009.

SANTOS, S. et al. **Câncer de mama em mulheres jovens: incidência, mortalidade e associação com os polimorfismos dos genes NQO1, CYP17 e CYP19.** 2013. Tese de Doutorado- Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013.

SARAJI, M. et al. Analysis of narcotic drugs in biological samples using hollow fiber liquid-phase microextraction and gas chromatography with nitrogen phosphorus detection. **Microchimica Acta**, v. 174, p. 159-166, 2011.

SASAKI, N. et al. Salivary bisphenol-A levels detected by ELISA after restoration with composite resin. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 16, n. 4, p. 297-300, 2005.

SAVASTANO, S. et al. Bisphenol-A plasma levels are related to inflammatory markers, visceral obesity and insulin-resistance: a cross-sectional study on adult male population. **Journal of translational medicine**, v. 13, n. 1, p. 169, 2015.

SCHETTLER, T. et al. Human exposure to phthalates via consumer products. **International journal of andrology**, v. 29, n. 1, p. 134-139, 2006.

SERRANO, S. et al. Phthalates and diet: a review of the food monitoring and epidemiology data. **Environmental Health**, v. 13, n. 1, p. 43, 2014.

SHELBY, M. et al. National Toxicology Program Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction: guidelines for CERHR expert panel members. **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 74, n. 1, p. 9-16, 2005.

SHEN, Y. et al. Higher urinary bisphenol A concentration is associated with unexplained recurrent miscarriage risk: evidence from a case-control study in eastern China. **PloS one**, v. 10, n. 5, 2015.

SILVA, M. et al. **Avaliação da neurotoxicidade do Bisfenol A em cultura primária de hipocampo**. 2016. Dissertação (Mestrado em toxicologia e análises toxicológicas)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9141/tde-04102016-152552/>>. Acesso em: 2018-01-17.

SILVA, M. et al. Urinary levels of seven phthalate metabolites in the US population from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999-2000. **Environmental health perspectives**, v. 112, n. 3, p. 331, 2004.

SILVA, M. et al. Detection of phthalate metabolites in human saliva. **Archives of toxicology**, v. 79, n. 11, p. 647-652, 2005.

SILVA, M. et al. Metabolite profiles of di-n-butyl phthalate in humans and rats. **Environmental science & technology**, v. 41, n. 21, p. 7576-7580, 2007.

SKOOG, D. **Fundamentos de Química Analítica**. Pioneira Thomsom Learning; São Paulo, 2005.

SOFOU, A. et al. HPLC determination of residual monomers released from heat-cured acrylic resins. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 381, n. 7, p. 1336-1346, 2005.

SONG, N. et al. Biomonitoring of urinary di(2-ethylhexyl) phthalate metabolites of mother and child pairs in South Korea. **Environment International**, v. 54, p. 65-73, 2013.

SOTO, A. et al. Does cancer start in the womb? Altered mammary gland development and predisposition to breast cancer due to in utero exposure to endocrine disruptors. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 18, n. 2, p. 199-208, 2013.

STAHLHUT, R. et al. Concentrations of urinary phthalate metabolites are associated with increased waist circumference and insulin resistance in adult US males. **Environmental health perspectives**, p. 876-882, 2007.

STAHLSCHMIDT-ALLNER, P. et al. Endocrine disrupters in the aquatic environment. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 4, n. 3, p. 155-162, 1997.

SUN, M et al. Graphene reinforced hollow fiber liquid-phase microextraction for the determination of phthalates in water, juice and milk samples by HPLC, **Analytical Methods** v.5, p. 5694-5700, 2013.

TAN, X. et al. Determination of Trace Bisphenol A in Water Using Three-phase Hollow Fiber Liquid-phase Microextraction Coupled with High Performance Liquid Chromatography. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 40, n. 9, p. 1409-1414, 2012.

TANAKA, T. et al. Reproductive and neurobehavioural toxicity study of bis (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) administered to mice in the diet. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 10, p. 1499-1506, 2002.

TEEGUARDEN, J. et al. A systematic review of Bisphenol A “low dose” studies in the context of human exposure: a case for establishing standards for reporting “low-dose” effects of chemicals. **Food and chemical toxicology**, v. 62, p. 935-948, 2013.

TOMINAGA, T. et al. Toxicokinetics of bisphenol A in rats, monkeys and chimpanzees by the LC–MS/MS method. **Toxicology**, v. 226, n. 2, p. 208-217, 2006.

TRANFO, G. et al. Urinary phthalate monoesters concentration in couples with infertility problems. **Toxicology letters**, v. 213, n. 1, p. 15-20, 2012.

UPSON, K. et al. Phthalates and risk of endometriosis. **Environmental Research**, v. 126, p. 91-7, Oct 2013.

VENTRICE, P. et al. Phthalates: European regulation, chemistry, pharmacokinetic and related toxicity. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 36, n. 1, p. 88-96, 2013.

WANG, Y. et al. Possible mechanism of phthalates-induced tumorigenesis. **The Kaohsiung journal of medical sciences**, v. 28, n. 7, p. S22-S27, 2012.

WITTASSEK, M. et al. Phthalates: metabolism and exposure. **International journal of andrology**, v. 31, n. 2, p. 131-138, 2008.

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](http://unep.org/pdf/9789241505031_eng.pdf) (accessed 27/02/2018)."

WOLFF, M. et al. Investigation of relationships between urinary biomarkers of phytoestrogens, phthalates, and phenols and pubertal stages in girls. **Environmental health perspectives**, p. 1039-1046, 2010.

WU, P. et al. Determination of phthalate esters in non-alcoholic beverages by GC–MS and optimization of the extraction conditions. **European Food Research and Technology**, v. 238, n. 4, p. 607-612, 2014.

XU, J. et al. Dynamic liquid-phase microextraction of three phthalate esters from water samples and determination by gas chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 597, n. 1, p. 1-5, 2007.

YAMINI, Y. et al. Online Injection-Based Hollow Fiber Liquid-Phase Microextraction–High-Performance Liquid Chromatography as a Fully Automatic Sample Processing for Phthalate Esters Analysis. **Food analytical methods**, v. 9, n. 3, p. 729-737, 2016.

ZANATTA, A. et al. **Expressão proteica do gene HOXA10 e dos receptores de estrogênio e progesterona no epitélio, estroma e tecido muscular liso perilesional de endometriose e do reto-sigmoide**. 2013. Tese de Doutorado- Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013. Doi:10.11606/T.5.2013tde-06112013-085759. Acesso em:2018-01-17

## ANEXOS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Desenvolvimento de método para determinação dos principais metabólitos de ftalatos em fluidos biológicos através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

**Pesquisador:** Helvécio Costa Menezes

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 69145317.7.0000.5149

**Instituição Proponente:** Instituto de Ciências Exatas

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.206.413

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto da área de Ciências Exatas cuja proposta é desenvolver método de microextração em fase líquida empregando membrana cilíndricas ocas (hollow fiber-based liquid phase microextraction HF-LPME) para amostragem de metabólitos de ftalatos em urina e análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Segundo o proponente, os ftalatos são compostos químicos conhecidos como Desreguladores Endócrinos (Endocrine Disrupting-Chemicals-EDCs), que podem interferir no metabolismo endócrino dos seres vivos afetando a saúde do indivíduo. O ser humano está exposto a esses compostos por diversas vias, como o contato dérmico, inalação e principalmente através da ingestão de água ou comida contaminada. Os ftalatos apresentam-se como produtos químicos, líquidos, incolores e inodoros, com diversas aplicações na indústria principalmente como plastificantes, como solubilizantes ou agentes de estabilização na produção de detergentes, cosméticos, brinquedos, dispositivos médicos, tintas, dentre outros. A análise dos metabólitos de ftalatos pode ser realizada para avaliar a relação entre a presença destes compostos no organismo e o surgimento de determinadas doenças buscando estabelecer umnexo-causal para as mesmas. O projeto em questão envolve a obtenção de urina de 30 indivíduos voluntários, homens e mulheres escolhidos aleatoriamente, maiores de 18 anos, para utilização na avaliação do método proposto de análise de ftalatos.

**Endereço:** Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2ª Ad Sítio 2005  
**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901  
**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE  
**Telefone:** (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 2.206.413

Justificativa de Ausência	TCLEGabriela2.pdf	24/07/2017 12:33:16	Helvécio Costa Menezes	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetoGabriela.pdf	01/06/2017 11:27:57	Helvécio Costa Menezes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEGabriela.pdf	01/06/2017 11:26:19	Helvécio Costa Menezes	Aceito
Outros	termosdecompromisso.pdf	30/05/2017 19:03:00	Helvécio Costa Menezes	Aceito
Outros	parecer.pdf	30/05/2017 18:54:53	Helvécio Costa Menezes	Aceito
Outros	autorizacao.pdf	30/05/2017 18:53:39	Helvécio Costa Menezes	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostoo.pdf	30/05/2017 18:47:18	Helvécio Costa Menezes	Aceito
Outros	691453177aprovacaoassinada.pdf	08/08/2017 09:57:57	Vivian Resende	Aceito
Outros	691453177parecerassinado.pdf	08/08/2017 09:58:04	Vivian Resende	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BELO HORIZONTE, 08 de Agosto de 2017

Assinado por:  
Vivian Resende  
(Coordenador)

Continuação do Parecer: 2.272.002

de 30 indivíduos voluntários, homens e mulheres escolhidos aleatoriamente, maiores de 18 anos, para utilização na avaliação do método proposto de análise de ftalatos.

**Critério de Inclusão:**

Indivíduos do sexo feminino e masculino maiores de 18 anos

Para a saliva serão coletadas amostras de indivíduos do sexo feminino e masculino que foram expostos à resinas odontológicas em um período de 10 minutos.

**Critério de Exclusão:**

Indivíduos menores de 18 anos

Para a saliva: Indivíduos que não foram expostos ao tratamento dentário com resina odontológica

Continuação do Parecer: 2.272.002

Outros	parecer.pdf	30/05/2017 18:54:53	Helvécio Costa Menezes	Aceito
Outros	autorizacao.pdf	30/05/2017 18:53:39	Helvécio Costa Menezes	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostoo.pdf	30/05/2017 18:47:18	Helvécio Costa Menezes	Aceito

**Situação do**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BELO HORIZONTE, 13 de Setembro de 2017



Assinado por:  
Vivian Resende  
(Coordenador)

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad Sl 2005  
Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901  
UF: MG Município: BELO HORIZONTE  
Telefone: (31)3409-4592 E-mail: coep@prpq.ufmg.br



## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) a participar da pesquisa “**Desenvolvimento de método para determinação dos principais metabólitos de ftalatos em fluidos biológicos através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas**”. Neste estudo pretendemos avaliar, o nível de contaminação de metabólitos de ftalatos na urina de indivíduos.

O motivo que nos leva a esse estudo é o risco do desenvolvimento de diversas doenças como câncer, diabetes, alergias, endometriose, deformações no sistema reprodutor feminino e masculino causado pela presença desses contaminantes no organismo humano.

Para este estudo adotaremos os seguintes procedimentos: desenvolvimento do método, coleta de 30mL de urina e análise das amostras, tratamento e discussão dos resultados. Ao final os materiais coletados serão identificados através de códigos. Após a coleta será necessário que você responda a um questionário, que demandará menos que 15 min da sua atenção, cujas informações ajudarão na interpretação dos resultados.

Os riscos estão relacionados somente ao nervosismo e/ou constrangimento devido ao recolhimento de amostra biológica. Será minimizado, garantindo ao voluntário que os resultados serão usados somente para fins científicos, preservando a integridade do indivíduo.

Para participar deste estudo você receberá um frasco para a coleta do material, após a coleta a amostra poderá ser devolvida em pelo menos 24h para à estudante de pós-graduação **Gabriela Dias Cerqueira** que as armazenará de forma adequada. Você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Você será esclarecido (a) sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou não. Poderá interromper sua participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade. O pesquisador irá tratar a sua identidade com sigilo e os resultados da pesquisa estarão à sua disposição, quando finalizada.

Após a realização das análises necessárias o material coletado será descartado de maneira adequada.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma via será arquivada pelo pesquisador responsável, no Departamento de Química da UFMG e a segunda via de igual teor da original será fornecida a você.

Toda a dúvida que você tiver a respeito desta pesquisa, poderá perguntar diretamente para Helvécio Costa Menezes na Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 Pampulha, departamento de Química sala 259 CEP:31270-901 - Belo Horizonte – MG. Telefone 31 34095725 ou email [helveciomenzes@hotmail.com](mailto:helveciomenzes@hotmail.com).

Dúvidas sobre a pesquisa envolvendo princípios éticos poderão ser questionadas ao **Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG**. Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 – Pampulha- Unidade Administrativa II - 2o. Andar - Sala 2005 CEP:31270-901 - Belo Horizonte – MG. Telefax: 3409-4592 E-mail: [coep@prpq.ufmg.br](mailto:coep@prpq.ufmg.br)

Eu \_\_\_\_\_ portador(a) do documento de identidade \_\_\_\_\_ fui informado(a) dos objetivos do estudo “**Desenvolvimento de método para determinação dos principais metabólitos de ftalato em fluidos biológicos através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas**”, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma via deste termo de livre consentimento.

Belo Horizonte, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2017.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Participante

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) a participar da pesquisa “**Desenvolvimento de método para determinação dos principais metabólitos de ftalatos em fluidos biológicos através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas**”. Neste estudo pretendemos avaliar, o nível de contaminação de metabólitos de ftalatos na saliva de indivíduos.

O motivo que nos leva a esse estudo é o risco do desenvolvimento de diversas doenças como câncer, diabetes, alergias, endometriose, deformações no sistema reprodutor feminino e masculino causado pela presença desses contaminantes no organismo humano.

Para este estudo adotaremos os seguintes procedimentos: desenvolvimento do método, coleta de 3 mL de saliva e análise das amostras, tratamento e discussão dos resultados. Ao final os materiais coletados serão identificados através de códigos.

Os riscos estão relacionados somente ao nervosismo e/ou constrangimento devido ao recolhimento de amostra biológica. Será minimizado, garantindo ao voluntário que os resultados serão usados somente para fins científicos, preservando a integridade do indivíduo.

Para participar deste estudo você receberá um frasco para a coleta do material, após a coleta a amostra poderá ser devolvida para o dentista **Dr. Alexandre Eustáquio Camargos Rocha CRO: MG 16.304** que as armazenará de forma adequada. Você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Você será esclarecido (a) sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou não. Poderá interromper sua participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade. O pesquisador irá tratar a sua identidade com sigilo e os resultados da pesquisa estarão à sua disposição, quando finalizada.

Após a realização das análises necessárias o material coletado será descartado de maneira adequada.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma via será arquivada pelo pesquisador responsável, no Departamento de Química da UFMG e a segunda via de igual teor da original será fornecida a você.

Toda a dúvida que você tiver a respeito desta pesquisa, poderá perguntar diretamente para Helvécio Costa Menezes na Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 Pampulha, departamento de Química sala 259 CEP:31270-901 - Belo Horizonte – MG. Telefone 31 34095725 ou email [helveciomenzes@hotmail.com](mailto:helveciomenzes@hotmail.com).

Dúvidas sobre a pesquisa envolvendo princípios éticos poderão ser questionadas ao **Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG**. Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 – Pampulha- Unidade Administrativa II - 2o. Andar - Sala 2005 CEP:31270-901 - Belo Horizonte – MG. Telefax: 3409-4592 E-mail: [coep@prpq.ufmg.br](mailto:coep@prpq.ufmg.br)

Eu \_\_\_\_\_ portador(a) do documento de identidade \_\_\_\_\_ fui informado(a) dos objetivos do estudo “**Desenvolvimento de método para determinação dos principais metabólitos de ftalato em fluidos biológicos através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas**”, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma via deste termo de livre consentimento.

Belo Horizonte, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2017.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Participante

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador