

FERNANDA ZAMPIERI LEANDRO

**“BISFENOL A: VALIDAÇÃO DE MÉTODO E
OCORRÊNCIA EM ÁGUA SUPERFICIAL E TRATADA DA
CIDADE DE ARARAQUARA”**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO INSTITUTO DE
QUÍMICA, UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA,
COMO PARTE DOS REQUISITOS PARA OBTENÇÃO
DO TÍTULO DE MESTRE EM QUÍMICA.

ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARY ROSA R. MARCHI

ARARAQUARA
2006

“Dedico esta dissertação às pessoas mais importantes da minha vida: Leandro e Izilda, meus pais; Estela, minha irmã.”

Agradecimentos Especiais

GOSTARIA DE AGRADECER À PROFA. DRA. MARY ROSA RODRIGUES DE MARCHI PELA OPORTUNIDADE DE FAZER MEU MESTRADO SOB A SUA ORIENTAÇÃO.

AGRADECIMENTO ESPECIAL TAMBÉM À SOLANGE LUIZ!

MUITO OBRIGADA!!!

Agradecimentos

À TÉCNICA DO NOSSO LABORATÓRIO, DONA MARILEI; AOS FUNCIONÁRIOS DA SEÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO (CÉLIA, PATRÍCIA E SANDRA); AOS FUNCIONÁRIOS DA BIBLIOTECA (CAMILA, VALÉRIA E FABIANA).

AO DEPARTAMENTO AUTÔNOMO DE ÁGUA E ESGOTOS DE ARARAQUARA (DAAE). EM ESPECIAL ÀS FUNCIONÁRIAS RENATA E SÔNIA.

À CAPES PELA BOLSA CONCEDIDA.

À PROFA. DRA CECÍLIA LALUCE PELA OPORTUNIDADE DE TER SIDO SUA ALUNA DE ESTÁGIO DOCÊNCIA.

AOS DOCENTES PRESENTES EM MINHA BANCA DE DEFESA DE MESTRADO, PROFA. DRA. ENY MARIA VIEIRA E PROF. DR. MANUEL LIMA DE MENEZES.

AOS AMIGOS PAULA SACCO, ANDRÉIA CECÍLIO, KÁTIA EMI, ANTÔNIO CLÓVIS, LUCIANA, JOÃO BATISTA E JOSÉ ANTÔNIO PELOS MOMENTOS HILÁRIOS, DE AJUDA, CARINHO E COMPANHEIRISMO.

E SOBRETUDO... A DEUS!!!

“Se algo der errado na vida, nunca desanime, pois o sol,
ao nascer, oferece um espetáculo tão lindo que a maioria
das pessoas ainda estão dormindo.”

RESUMO

Palavras-chave: BISFENOL A; ÁGUA; HPLC; SPE.

Atualmente há um grande interesse no estudo dos desreguladores endócrinos (substâncias estranhas aos organismos, que mimetizam ou bloqueiam a ação natural dos hormônios naturais), tanto em relação ao seu destino ambiental quanto à toxicologia dos mesmos. Neste trabalho, avaliou-se o Bisfenol A (BPA), um monômero do qual se produz o plástico policarbonato. Recentemente foi proposto que o BPA exibe atividade estrogênica em concentrações de 1 ng mL^{-1} .

Neste trabalho, desenvolveu-se um método para a determinação de BPA em águas naturais, fazendo-se uso de cartuchos de poliestireno-divinilbenzeno (PSDVB) para a extração em fase sólida (SPE) e cromatografia líquida de alta eficiência com um detector de fluorescência (HPLC/FLU) para a quantificação do composto.

A recuperação do método foi avaliada utilizando-se amostras de água potável fortificada em 3 níveis de concentração: 0,06; 0,2 e 0,6 ng mL^{-1} . A extração do analito (500 mL; n=4) resultou valores de recuperações entre 99 e 100% e CV entre 0,30 e 3,9%. Os limites de detecção e quantificação do método foram 0,02 e 0,06 ng mL^{-1} , respectivamente.

O mesmo estudo foi efetuado para água superficial sendo obtidos valores de recuperação entre 85,8 e 87% para níveis de fortificação similares aos utilizados para água potável, com CV entre 1,1 e 2,3%.

O método validado foi aplicado com bom desempenho às amostras de água de entrada e saída da Estação de Tratamento de Água, onde constatou-se a presença de BPA entre 11,7 e 16,8 ng mL⁻¹ na água bruta e 6,2 e 7,3 ng mL⁻¹ na água potável.

Desta forma, o monitoramento ambiental do BPA torna-se extremamente relevante e necessário.

ABSTRACT

Key-words: BISPHENOL A; WATER; HPLC; SPE.

Nowadays it has been increased the concern about endocrine disrupters (unknown substances for organisms that mimic or block the natural action of endogenous hormones), so much at relation of your environmental fate as toxicology about them. In this study, it had been evaluated Bisphenol A, a monomer, witch produces polycarbonate. Recently, it has been proposed that BPA exhibits estrogenic activity at 1 ng mL^{-1} .

At this work, it had been developed a method for determination of BPA at natural water with polystyrene-divinylbenzene (PSDB) cartridge on phase solid extraction and high performance chromatography liquid with fluorescence detection (HPLC/FLU) for the analyte's quantification.

The method's recovery was evaluated with spiked drink water sample at three concentrations levels: 0,06; 0,2 and $0,6 \text{ ng mL}^{-1}$. The analyte extraction (500 mL; 4) gave recoveries between 99 and 100% with CV between 0,30 and 3,9%. The method detection and quantification limits were 0,02 and $0,06 \text{ ng mL}^{-1}$, respectively.

The same study was developed for superficial water with recoveries between 85,8% and 87% for similar spiked levels at the drink water with CV between 1,1 and 2,3%.

The method developed was applied with good performance at water's samples of Water Treatment Plant, verifying the appearance of BPA between 11,7 and 16,8 ng mL⁻¹ on sewage water and 6,2 until 7,3 ng mL⁻¹ on drink water.

Therefore the environmental monitoring of BPA is very important and indispensable.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do Bisfenol A	29
Figura 2. Localização do Aqüífero Guarani	32
Figura 3. Bacia do Aqüífero Guarani	33
Figura 4. Captação das Cruzes	35
Figura 5. Captação de Anhumas	36
Figura 6. Captação Paiol	36
Figura 7. Poço Aldo Lupo	36
Figura 8. Frasco de vidro âmbar (4 L)	59
Figura 9. Sistema de Extração em Fase Sólida	61
Figura 10. Adutoras dos Rios Ribeirão das Cruzes e Anhumas	62
Figura 11. Frasco Coletor (500 mL)	62
Figura 12. Coleta da água bruta	63
Figura 13. Sistema de Filtração	63
Figura 14. Reservatório 2 (água potável)	64
Figura 15. Espectro de Absorção do BPA no UV-Vis	66
Figura 16. Curva Analítica HPLC/UV	66
Figura 17. Cromatograma de uma solução de trabalho ($3 \mu\text{g mL}^{-1}$)	67
Figura 18. Espectro de Fluorescência 3D do BPA	67
Figura 19. Espectro de Fluorescência 3D do BPA plotado no Origin	68
Figura 20. Curva Analítica HPLC/FLU	69
Figura 21. Cromatogramas de uma solução padrão de 500 ng mL^{-1} de BPA	69
Figura 22. Curva de Linearidade do HPLC/FLU	71
Figura 23. Cromatogramas dos extratos do branco, testemunha, água fortificada e padrão	72
Figura 24. Cromatogramas dos extratos do branco, testemunha, água fortificada e padrão	72
Figura 25. Cromatogramas dos extratos do branco, testemunha, água fortificada e padrão	73
Figura 26. Cromatogramas do extrato da água de torneira fortificada e padrão 100 ng mL^{-1}	74
Figura 27. Cromatogramas do extrato da água de torneira fortificada e padrão 300 ng mL^{-1}	75
Figura 28. Cromatograma do extrato da água bruta	77
Figura 29. Cromatograma do extrato da água potável	77
Figura 30. Cromatograma do extrato da água bruta fortificada e solução padrão 30 ng mL^{-1}	78
Figura 31. Cromatograma do extrato da água bruta fortificada e solução padrão 50 ng mL^{-1}	79
Figura 32. Cromatograma do extrato da água bruta fortificada e solução padrão 100 ng mL^{-1}	79

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1. Evolução cronológica dos fatos e evidências que conduziram às suspeitas quanto aos efeitos adversos causados pelos xeno-estrogênios</i> ^[10]	24
<i>Tabela 2. Possíveis mecanismos de ação dos desreguladores endócrinos (DEs) e respectivos efeitos</i> ^[10]	26
<i>Tabela 3. Propriedades Físico-Químicas do BPA</i> ^[23,31]	30
<i>Tabela 4. Matriz, extração, técnica analítica e respectivas referências reportadas na literatura em relação à análise de Bisfenol A</i>	43
<i>Tabela 5. Agências Reguladoras e respectivos Parâmetros de Desempenho Analítico</i>	48
<i>Tabela 6. Concentração do padrão na curva e na amostra fortificada</i>	59
<i>Tabela 7. Limites de Detecção, Quantificação e Coeficiente de Variação dos Sistemas Estudados</i>	70
<i>Tabela 8. Comparação entre eluentes através de seus valores de recuperação (R) e Coeficiente de Variação (CV) para amostra de água potável fortificada com 30 ng mL⁻¹</i>	73
<i>Tabela 9. Níveis de Fortificação da Água de Torneira e respectivos valores de Recuperação (R) e Coeficiente de Variação (CV)</i>	74
<i>Tabela 10. Parâmetros de Validação obtidos para o método desenvolvido para a análise de BPA em água, usando SPE com cartucho de PSDVB (n=4) e determinação por HPLC/FLU</i>	75
<i>Tabela 11. Características Físico-Químicas da Água Bruta da ETA-Fonte</i>	76
<i>Tabela 12. Características Físico-Químicas da Água Potável da ETA-Fonte</i>	76
<i>Tabela 13. Níveis de fortificação da água bruta e seus respectivos valores de Recuperação e Coeficiente de Variação</i>	80
<i>Tabela 14. Comparação entre o método desenvolvido e métodos descritos na literatura</i>	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN - Acetonitrila

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BPA - Bisfenol A

CONAMA - Conselho Nacional de Meio Ambiente

EC SCF - European Commission Scientific Committee on Food

ECD - Detector eletroquímico

ENV+ - Resina copolimérica de poliestireno

ETA - Estação de Tratamento de Água

FLU - Fluorescência

GC - Cromatografia Gasosa

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

ICH - International Conference Harmonization

IPCS - International Program on Chemical Safety (Programa Internacional em Segurança Química)

IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry

LD - Limite de detecção

LLE - Extração Líquido-Líquido

LQ - Limite de quantificação

MS - Espectrometria de Massas

OECD - Organization for Economic Cooperation and Development

OMS - Organização Mundial de Saúde

PSDVB – Poliestireno-divinilbenzeno

SBSE - Stir bar sorptive extração (extração com barras magnéticas)

SCTEE - Scientific Committee for Toxicity, Ecotoxicity and the Environment
(Comitê Científico para Toxicologia, Ecotoxicologia e Ambiente)

SPE- Extração em fase sólida

SPME - Micro extração em fase sólida

USEPA - United States Environmental Protection Agency (Agência de
Proteção Ambiental dos Estados Unidos)

USP - Farmacopéia Americana

UV - Ultra-violeta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. SISTEMA ENDÓCRINO	18
1.1.1. TIPOS DE HORMÔNIOS	19
1.2. DESREGULADORES ENDÓCRINOS	21
1.2.1. MECANISMO DE DESREGULAÇÃO ENDÓCRINA	24
1.2.2. ESTRATÉGIAS PARA O MONITORAMENTO AMBIENTAL DE XENO-ESTROGÊNIOS	27
1.2.3. BISFENOL A	28
1.3. ABASTECIMENTO DE ÁGUA DA CIDADE DE ARARAQUARA	31
1.3.1. AQÜÍFERO GUARANI	31
1.3.2. CAPTAÇÃO DE ÁGUA	35
1.3.2.1. CAPTAÇÃO SUPERFICIAL	35
1.3.2.2. CAPTAÇÃO SUBTERRÂNEA	36
1.3.3.2. DECANTAÇÃO	37
1.3.3.3. FILTRAGEM	38
1.3.3.4. FLUORETAÇÃO E CLORAÇÃO	38
1.4. AMOSTRAGEM	39
1.5. DETERMINAÇÃO DE BISFENOL A	41
1.5.1. ENSAIOS BIOLÓGICOS	41
1.5.2. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS	42
1.6. VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO	43
1.6.1. PARÂMETROS DE DESEMPENHO ANALÍTICO	44
1.6.1.1. EXATIDÃO	44
1.6.1.2. PRECISÃO	45
1.6.1.3. LIMITE DE DETECÇÃO	46
1.6.1.4. LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	46
1.6.1.5. LINEARIDADE E FAIXA LINEAR	47
1.6.1.6. ROBUSTEZ	47
2. OBJETIVOS	51

3. PARTE EXPERIMENTAL	52
3.1. MATERIAIS E MÉTODOS	52
3.1.1. MATERIAIS	52
3.1.1.1. REAGENTES, SOLVENTES E PADRÃO	52
3.1.1.2. GÁS UTILIZADO PARA PRÉ-CONCENTRAR AMOSTRAS	52
3.1.1.3. COLUNA CROMATOGRÁFICA	52
3.1.1.4. EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA	53
3.1.2. EQUIPAMENTOS DE BANCADA E ELETRÔNICOS	53
3.1.2.1. EQUIPAMENTOS DE BANCADA	53
3.1.2.2. EQUIPAMENTOS ELETRÔNICOS	54
3.1.3. SOLUÇÕES PADRÃO	54
3.2. MÉTODOS	55
3.2.1. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	55
3.2.2. DETERMINAÇÃO DO LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS EQUIPAMENTOS	56
3.2.3. DETERMINAÇÃO DA LINEARIDADE DE RESPOSTA DO DETECTOR	56
3.3. TRATAMENTO DAS AMOSTRAS	57
3.3.1. EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA	57
3.3.2. AVALIAÇÃO DO MÉTODO	58
3.3.2.1. FORTIFICAÇÃO	58
3.3.2.2. ESTUDO DE RECUPERAÇÃO	60
3.4. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA	64
3.5. LIMPEZA DA VIDRARIA	65
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	65
4.1. ANÁLISE NO ESPECTROFOTÔMETRO (UV-VIS)	65
4.1.1. ANÁLISE NO HPLC/UV	66
4.2. ANÁLISE NO ESPECTROFLUORÍMETRO	67
4.2.1. ANÁLISE NO HPLC/FLU	68
4.3. LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS SISTEMAS ANALÍTICOS UTILIZADOS	70
4.4. LINEARIDADE E FAIXA LINEAR	70
4.5. VALIDAÇÃO DO MÉTODO	71

4.5.1. ESTUDO DE RECUPERAÇÃO	71
4.6. APLICAÇÃO DO MÉTODO	76
4.6.1. AMOSTRA REAL	76
4.7. EFICIÊNCIA DO MÉTODO PARA ÁGUA BRUTA	78
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	83
REFERÊNCIAS	84



1. INTRODUÇÃO

Atualmente há uma preocupação crescente com ação perturbadora que diversos poluentes orgânicos presentes no meio ambiente desencadeiam no sistema endócrino dos animais, causando efeitos adversos à saúde, alterações do comportamento e anomalias na função reprodutiva.

Estas substâncias são, em sua maioria, poluentes químicos e derivados de produtos químicos antropogênicos, provenientes de pesticidas, plásticos, detergentes, tintas ou ainda constituem diversos tipos de resíduos industriais ou domésticos. Geralmente, são compostos muito estáveis, lipofílicos e semivoláteis, o que facilita a rápida e vasta dispersão ambiental, tendo como principais veículos os recursos hídricos e zonas marítimas. A função hormonal mais afetada por estes agentes artificiais é o mecanismo de regulação dos esteróides, que determinam principalmente as características sexuais e o comportamento das espécies.

O despertar para esta problemática com repercussão mundial, surgiu concretamente em alguns rios e lagos dos Estados Unidos, Canadá, Alemanha, Portugal e Itália devido ao ressurgimento de elevados níveis de poluição, afetando algumas espécies de peixes, aves e répteis dentre outras ^[1-8].

Este foi o ponto de partida para a eclosão mundial de inúmeras pesquisas em busca dos designados desreguladores (também conhecidos como alteradores ou disruptores) endócrinos.



1.1. SISTEMA ENDÓCRINO

O sistema endócrino é uma complexa rede de sinais e mensagens químicas que controla as funções e reações corporais em quase todos os animais, vertebrados (mamíferos, peixes, aves, répteis e anfíbios) e invertebrados (moluscos e insetos), interagindo diretamente com o sistema nervoso.

No Homem, é constituído por três partes distintas, designadas por um conjunto de glândulas especializadas, como o hipotálamo, as glândulas pituitárias, tireóide e paratireóide, as adrenais, o pâncreas e as gônadas entre outras, por mensageiros químicos também designados hormônios, sintetizados e segregados nas glândulas e finalmente por células-alvo, que recebem os hormônios e desta forma, respondem às necessidades corporais.

O hipotálamo regula as glândulas pituitárias ou hipófise (anterior e posterior) situadas junto ao cérebro, que por sua vez, controlam diversas funções, principalmente, a secreção das gônadas (testículos nos machos e ovários nas fêmeas), as glândulas tireóide, paratireóides e adrenais, as quais estimulam ou controlam respectivamente o crescimento, a temperatura, a formação óssea, o balanço salino, entre outras funções orgânicas. O pâncreas secreta hormônios que controlam o sistema digestivo, a insulina e o glucagon e também outros tipos de substâncias reguladoras dos níveis de glicose, glicogênio e lipídeos. Os ovários e os testículos controlam as funções sexuais características, o comportamento e os hormônios sexuais que incluem o estrogênio (17 β -estradiol) e o androgênio (testosterona), respectivamente.



O mecanismo de acionamento do sistema endócrino tem início na reação de células nervosas a um determinado estímulo, por exemplo, medo, fome ou a alteração da temperatura corporal, enviando posteriormente um sinal às glândulas endócrinas. Estas, por sua vez, liberam os hormônios adequados que levarão as instruções para as células-alvo onde se ligarão a receptores que se localizam no núcleo. O receptor então, interpreta a mensagem e faz a tradução mediante um dos processos celulares distintos: a) ordena aos genes que produzam novas proteínas, o que causa efeitos em longo prazo, como é o caso, por exemplo, do crescimento ou maturação sexual e reprodutiva; b) altera a atividade de proteínas existentes nas células, provocando uma resposta rápida por parte do organismo, que se repercute, por exemplo, no aumento do ritmo cardíaco ou na variação do nível de açúcar no sangue ^[9].

1.1.1. TIPOS DE HORMÔNIOS

Os hormônios são substâncias sinalizadoras que “viajam” através da corrente sanguínea e suscitam respostas em outras partes do corpo. Geralmente, podem ser diferenciados em dois tipos nos animais, dependendo da forma como são transmitidos e recebidos pelas células-alvo: i) hormônios protéicos, não esteróides, requerem emissores/receptores para se transferirem de uma célula para outra, considerados muito pouco solúveis na membrana celular lipídica pelo fato de serem geralmente constituídos por proteínas modificadas e apresentarem carga na estrutura; ii) hormônios esteróides que derivam do colesterol, não



necessitam destes emissores/receptores para atravessarem a membrana celular e difundir-se nas células, onde irão desempenhar ações intracelulares importantes (ex. síntese protéica), uma vez que possuem dimensões menores em relação ao tipo anterior e são substancialmente lipofílicos ^[9].

Os hormônios esteróides circulam livremente entre as células-alvo, interagindo posteriormente no seu interior com receptores nucleares muito específicos, formando complexos como um modelo “chave-fechadura”. O mecanismo relativo à recepção e ligação dos hormônios esteróides a receptores nucleares específicos nas células-alvo é essencial para a saúde dos organismos, pois também possui uma influência importante no respectivo metabolismo. Por exemplo, o estradiol é o hormônio responsável pela formação das características femininas, comportamento sexual, ciclos menstruais e ovulação. Além disso, influencia a formação óssea, sistema cardiovascular, memória, pele e sistema imunológico. Já a testosterona é o hormônio responsável pelas características sexuais masculinas, estando, por exemplo, associado à produção de esperma ^[9].

Os hormônios esteróides, também designados esteróides sexuais, regulam fundamentalmente a diferenciação sexual e são de extrema importância para o desenvolvimento embrionário dos animais. É exatamente pela enorme importância biológica destes esteróides que muitos dos produtos químicos antropogênicos podem ser prejudiciais, mimetizando ou bloqueando a ação dos hormônios naturais visto que apresentam estruturas químicas e grupos funcionais muito semelhantes. Já os hormônios protéicos estão mais resguardados a este



“fenômeno”, uma vez que apresentam um mecanismo de atuação muito mais complexo ^[9].

Deve-se salientar que o sistema hormonal nos organismos é estimulado por baixíssimas concentrações de esteróides, da ordem ppt (parte por trilhão) ou ppb (parte por bilhão), o que torna o fato de químicos orgânicos exógenos poderem ser tão perniciosos.

1.2. DE



endócrino dos animais, alterando o desenvolvimento e/ou a reprodução dos organismos, não sendo, no entanto, gerados ou produzidos por esses mesmos organismos. Ressalta-se, porém que, processos como biodegradação, fotólise e adsorção contribuem para a remoção parcial dos hormônios lançados nos corpos d'água ^[11-13].

Os disruptores ou desreguladores endócrinos (neste trabalho optou-se pela segunda denominação) encontram-se principalmente entre classes de compostos com origem em produtos ou sub-produtos químicos industriais (por exemplo, ftalatos, fenóis, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, bifenilas policloradas), pesticidas, produtos naturais e hormônios sintéticos ^[14]. A seguir são listados alguns dos principais grupos de xenoestrogênios e suas principais fontes para o ambiente.

- Ftalatos: muito usados como aditivos na constituição de plásticos, principalmente PVC, e outros polímeros (ex. dibutilftalato);
- Fenóis: surfactantes usados como detergentes (ex. *p*-nonilfenol), componentes de resinas (ex. bisfenol A) e desinfetantes, como os clorofenóis (ex. 2,4,6, triclorofenol);
- Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs): provenientes de fontes naturais, como as erupções vulcânicas e de fontes antropogênicas como da queima de combustíveis fósseis e incineração de resíduos (ex. benzo[a]pireno);
- Bifenilas policloradas (BPCs) e dioxinas: grupo de compostos que genericamente estão associados e têm origem em diversos processos



industriais ou resultam como subprodutos da co-incineração (ex. 2,3,7,8-TCDD);

- Pesticidas e Biocidas: incluem diversos tipos de compostos muito utilizados especialmente na agricultura, como os organofosforados, propionamidas, triazínicos e organometálicos;
-



Tabela 1. Evolução cronológica dos fatos e evidências que conduziram às suspeitas quanto aos efeitos adversos causados pelos xeno-estrogênios^[10]

ANO	FATOS E EVIDÊNCIAS
1923	Detecta-se atividade estrogênica em extratos biológicos.
1930	Observam-se efeitos estrogênicos nos animais de laboratório quando expostos ao BPA.
1950	Observa-se que o diclorodifeniltricloro etano (DDT) evidencia atividade estrogênica.
1962	Surgem as primeiras correlações entre os pesticidas/químicos sintéticos e os problemas de saúde ambiental observadas na vida selvagem.
1963	Verifica-se que a exposição aos hormônios naturais é perigosa e leva ao câncer.
1968	Descobre-se que o DDT apresenta atividade estrogênica em mamíferos e aves.
1971	Verifica-se que o diclorodifenildicloro etano (DDE) está na origem do câncer vaginal, sobretudo em mulheres cujas mães estiveram expostas a este produto durante a gravidez.
1972	O DDT é proibido na agricultura
1976	Verifica-se que o DDE está interligado a problemas na reprodução humana.
1977	A produção e aplicação de bifenilas policloradas (PCBs) é restringida.
1980	A utilização de certos hormônios sintéticos é restringida.
1993	Detecta-se relação entre os xeno-estrogênios e problemas no aparelho reprodutivo masculino e feminino.
1996	Verifica-se que combinações de diversos xeno-estrogênios apresentam sinergismos em vários tipos de leveduras.
1998	Começam a se formar os primeiros grupos de investigação em nível mundial para estudar e dar resposta a esta problemática.
1999	Desenvolvem-se estudos <i>in-vitro</i> e <i>in-vivo</i> referentes à elaboração de listas de substâncias classificadas como contendo potencial de atividade estrogênica.

1.2.1. MECANISMO DE DESREGULAÇÃO ENDÓCRINA

Os desreguladores endócrinos afetam o sistema endócrino e conseqüentemente as funções vitais nos seres vivos, imitando, bloqueando ou



provocando o colapso dos hormônios esteróides caracterizando o mecanismo para esta desregulação como complexo e diversificado.

A alteração ou desregulação endócrina pode estar associada à interferências na síntese, secreção, transporte, ligação e ação ou eliminação dos hormônios naturais do organismo, conduzindo a uma nova resposta hormonal, fraca ou forte, que resulta em um sinal inexato para o corpo. Algumas substâncias podem, por exemplo, imitar a ação dos hormônios naturais levando o organismo a desencadear de um modo exagerado ou em um tempo inadequado a um estímulo falso, sendo o fenômeno designado por efeito agonista. Outras substâncias podem bloquear os receptores específicos ao determinado hormônio endógeno, reduzindo ou anulando os estímulos em certas partes do organismo que normalmente são sensíveis ao mesmo, sendo este fenômeno denominado efeito antagonista. Certos produtos farmacêuticos, como a pílula contraceptiva, são usados com a finalidade de causar intencionalmente alguns destes efeitos antagonistas, sendo que, por outro lado, o dietilestilbestrol é um bom exemplo de agonista superativo ^[10].

A Tabela 2 apresenta de forma esquematizada os possíveis mecanismos de ação dos desreguladores endócrinos.

**Tabela 2. Possíveis mecanismos de ação dos desreguladores endócrinos (DEs) e respectivos efeitos^[10]**

TIPO DE DE	MECANISMO DE AÇÃO	EFEITOS
Agonistas	Ocupam os receptores dos hormônios naturais mimetizando os seus efeitos.	A hiperestimulação dos receptores ou da sua produção pode provocar o desenvolvimento dos órgãos de reprodução, alterações comportamentais, etc.
Antagonistas	Bloqueiam os receptores dos hormônios naturais.	Inibem, em grau variável, a atividade dos hormônios naturais.
Estimuladores	Estimulam a formação de receptores nas células.	A ação dos hormônios naturais é ampliada, bem como a dos próprios DES.
Inibidores enzimáticos	Interferem na atividade das enzimas que metabolizam os hormônios naturais.	Hiperestimulação dos receptores pelos hormônios naturais que não são metabolizados e permanecem no organismo.
Destruidores hormonais	Reagem, direta ou indiretamente, com um hormônio natural, modificando a sua estrutura ou influenciando o ritmo da síntese dos hormônios naturais.	Diminuição da atividade dos hormônios naturais afetados.

Os principais fatores que influenciam o modo de atuação dos desreguladores endócrinos no organismo relacionam-se à natureza, concentração e tipo de interação, tempo e grau de exposição, fatores genéticos, especificidade dos tecidos, idade, sexo, entre outros.



Os efeitos adversos observados com maior freqüência na literatura verificam-se ao nível da reprodução anômala, indução cancerígena, alteração neurológica e imunológica. Na vida selvagem, verifica-se uma diminuição da taxa de reprodução em muitas espécies de peixes (ex, salmão), um acréscimo da mortalidade precoce de aves (ex, gaivotas), ressurgimento de casos de pseudo-hermafroditismo em muitas espécies marinhas (ex, gastrópodes), má formação genital em répteis (ex, crocodilos), além da extinção de diversas espécies costeiras (ex, ostras). Na população humana, tem-se constatado que os disruptores endócrinos estão associados ao decaimento na produção de esperma e aumento dos casos de câncer de próstata nos homens e, nas mulheres, disfunção ao nível dos ovários, infertilidade e má formação do feto ^[15-19].

No entanto, há alguma dificuldade em demonstrar de forma inequívoca a relação direta entre a exposição e os efeitos causados por determinado(s) desregulador(es) endócrino(s), não se sabendo ainda se a combinação de várias destas substâncias pode potencializar as nefastas conseqüências observadas até o momento. A informação relativa à exposição é geralmente incompleta, os mecanismos de atuação não estão ainda totalmente esclarecidos e outros fatores adicionais, como a dieta alimentar, não podem ser negligenciados.

1.2.2. ESTRATÉGIAS PARA O MONITORAMENTO AMBIENTAL DE XENO-ESTROGÊNIOS

A União Européia (EU), a Agência de Proteção Ambiental Norte-Americana (EPA), a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Organização para a



Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), evidenciaram há alguns anos sérias preocupações em relação aos efeitos provocados pelos xenoestrogênios. Estas instituições vêm dinamizando e apoiando diversas iniciativas no âmbito da investigação e desenvolvimento em nível internacional no sentido de esclarecer e solucionar os problemas causados por estes compostos [20].

O relatório de progresso sobre a estratégia comunitária em relação aos xeno-estrogênios (COM 706/1999), avaliou mais de 550 substâncias classificando 118 com potencial de atividade estrogênica comprovada [21]. Algumas destas substâncias apresentam um grande volume de produção ou persistência elevada,



O BPA possui dois grupos hidroxila-fenólicos (Figura 1), sendo obtido a partir da condensação de 2 mols de fenol com 1 mol de acetona. Sob condições ambiente, o BPA é um sólido e se apresenta na forma de flocos, cristais ou pérolas ^[23].

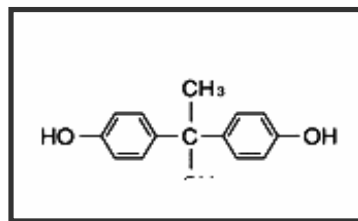


Figura 1. Estrutura do Bisfenol A

O BPA é um monômero a partir do qual se produz o plástico policarbonato (PC), exibindo atividade estrogênica em concentrações abaixo de 1 ppt. A estrogenicidade dos polímeros obtidos a partir do BPA deve estar relacionada aos seus monômeros não polimerizados ou à degradação química. Em relação ao mecanismo de desregulação endócrina, o BPA atua tanto quanto agonista como antagonista ^[24-28].

Apesar do policarbonato ser um plástico durável com boa estabilidade física, resistente às altas temperaturas, a migração das substâncias indesejáveis se dá em níveis traços, durante a esterilização do PC, revestimento epóxi das latas, embalagens de alimentos, resinas utilizadas em aplicações odontológicas (selantes dentários), e plásticos nos quais o BPA é usado como estabilizador ou antioxidante ^[29].

As resinas epóxi e plásticos policarbonatos podem ser degradados mecanicamente e termicamente, que é o maior problema de suas aplicações ^[30].



A sorção de BPA em partículas sólidas, como por exemplo, lodo, sedimentos, material particulado e biota, implica em um potencial arriscado em termos de impacto de ecotoxicologia, uma vez que 50% de BPA no ambiente têm o potencial de se ligar aos sedimentos e solos ^[23]. Portanto, precisa-se de avaliação dos seus níveis nos diversos compartimentos ambientais.

As propriedades físico-químicas (Tabela 3) e características do BPA controlam sua distribuição e destino final no ambiente. O BPA é um composto de média polaridade, moderadamente solúvel em água a temperatura ambiente e que se dissocia sob condições alcalinas ^[23,31].

Tabela 3. Propriedades Físico-Químicas do BPA ^[23,31]

Parâmetro	Valor
CAS N ^o	80-05-7
Massa Molar	228,29 g mol ⁻¹
Fórmula	C ₁₅ H ₁₆ O ₂



sendo que para ambos os órgãos regulamentadores o valor máximo é de 3mg Kg^{-1} [32,33]. As normas 76/893, 80/590, 82/711, 85/572 e 90/128 sumarizam as regulamentações européias dos polímeros em contato com os alimentos [34].

Alguns autores descreveram em seus estudos os limites para BPA em água potável adotando a faixa permitida pela EPA para o grupo dos fenóis ($60 - 400 \mu\text{g L}^{-1}$) [35]. No Brasil, a legislação do Ministério da Saúde que fixa o limite máximo de contaminantes que podem estar presentes na água potável, não faz alusão ao limite permitido para fenóis totais em água potável [36]. O Ministério do Meio Ambiente, através do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) determina que para águas naturais o teor máximo permitido para fenóis totais é de $3 \mu\text{g L}^{-1}$, para corpos d'água classes I e II, e de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ para os de classe III [37].

Portanto, a contaminação ambiental por estes compostos estrogênicos deve ser monitorada vigorosamente.

Neste trabalho, avaliou-se a água superficial e tratada da cidade de Araraquara-SP quanto à presença ou não do bisfenol A.

1.3. ABASTECIMENTO DE ÁGUA DA CIDADE DE ARARAQUARA

1.3.1. AQÜÍFERO GUARANI

O Aqüífero Guarani é o maior manancial de água doce subterrânea transfronteiriço do mundo. Está localizado na região centro-leste da América do Sul, entre 12° e 35° de latitude sul e entre 47° e 65° de longitude oeste e ocupa uma área de 1,2 milhões de Km^2 , estendendo-se pelo Brasil (840.000 Km^2),



Paraguai (58.500 Km²), Uruguai (58.500 Km²) e Argentina (255.000 Km²). Sua maior ocorrência se dá em território brasileiro (2/3 da área total), abrangendo os Estados de Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul conforme ilustrado na Figura 2.



Figura 2. Localização do Aquífero Guarani

(Fonte: www.daaearaquara.com.br/aquiferoguarani.htm)

Esse reservatório é formado por derrames de basalto ocorridos nos Períodos Triássico, Jurássico e Cretáceo Inferior (entre 200 e 132 milhões de anos), constituído pelos sedimentos arenosos da Formação Pirambóia na base (Formação Buena Vista na Argentina e Uruguai) e arenitos Botucatu no topo (Misiones-Paraguai, Tacuarembó no Uruguai e Argentina).

A espessura total do aquífero varia de valores superiores a 800 metros até a ausência completa de espessura em áreas internas da bacia. Considerando uma espessura média aquífera de 250 metros e porosidade efetiva de 15%, estima-se que as reservas permanentes do aquífero (água acumulada ao longo do tempo) sejam da ordem de 45.000 Km³.



O Aquífero Guarani constitui-se em uma importante reserva estratégica para o abastecimento da população, para o desenvolvimento das atividades econômicas e do lazer.

Sua recarga natural anual (principalmente pelas chuvas) é de 160 Km³/ano, sendo que desta, 40 Km³/ano constitui o potencial explorável sem riscos para o sistema aquífero.

Em geral, as águas são de boa qualidade para o abastecimento público e outros usos, sendo que em sua porção confinada, os poços têm cerca de 1.500 m de profundidade e podem produzir vazões superiores a 700 m³/h.

Além do Guarani, sob a superfície de São Paulo, há outro reservatório que se formou posteriormente, chamado Aquífero Bauru de acordo com a Figura 3. Ele é muito menor, mas tem capacidade suficiente para suprir as necessidades de fazendas e pequenas cidades.

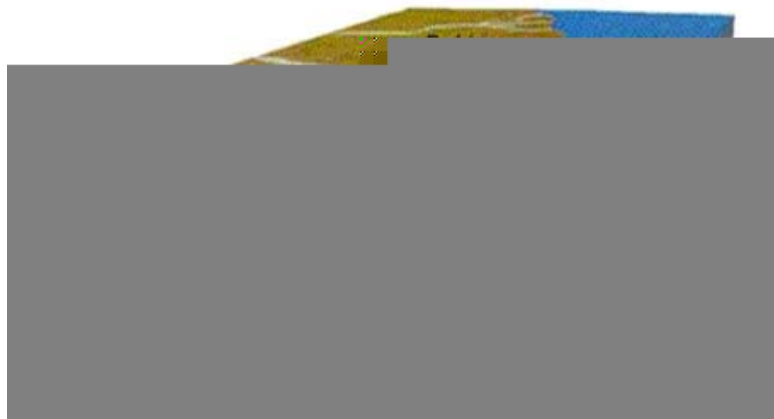


Figura 3. Bacia do Aquífero Guarani

(Fonte: www.daaearaquara.com.br/aquiferoguarani.htm)



No Estado de São Paulo, o Guarani é explorado por mais de 1000 poços e ocorre numa faixa no sentido sudoeste-nordeste. Sua área de recarga ocupa cerca de 17.000 Km² onde se encontram a maior parte dos poços. Esta área é a mais vulnerável e deve ser objeto de programas de planejamento e gestão ambiental permanentes para se evitar a contaminação da água subterrânea e sobreexploração do aquífero com o consequente rebaixamento do lençol freático e o impacto nos corpos d'água superficiais.

A localização do Município de Araraquara, na parte elevada dos Planaltos e Chapadas da Bacia do Paraná, em altitudes que chegam a superar os 750 m, e resultando em formas de relevo mais aplainadas (onde há rochas sedimentares) ou mais onduladas e formando espigões alongados (onde está a rocha basalto e o solo de terra roxa) é favorável ao desenvolvimento de uma rede hidrográfica muito numerosa.

Os cursos d'água existentes no Município de Araraquara, fazem parte de duas bacias hidrográficas - a do Rio Jacaré-Guaçu, a oeste, do afluente do Rio Tietê, e a do Rio Mogi-Guaçu, a leste, afluente do Rio Pardo.

Em Araraquara há 2 estações de tratamento de água: ETA FONTE (capacidade de tratamento: 600 L s⁻¹) e ETA PAIOL (capacidade de tratamento: 80 L s⁻¹) que são responsáveis pelo abastecimento de água potável da cidade, sendo que 50% da água potável de Araraquara provêm de poço e os outros 50% da Estação de Tratamento de Água (ETA) ^[38].



Figura 5. Captação de Anhumas



Figura 6. Captação Paiol

1.3.2.2. CAPTAÇÃO SUBTERRÂNEA

Atualmente, a cidade de Araraquara dispõe de 12 poços de captação subterrânea, com extração total de aproximadamente 35.600 m³ de água por dia. A Figura 7 ilustra o Poço Aldo Lupo.



Figura 7. Poço Aldo Lupo



1.3.3. ETAPAS DO TRATAMENTO DE ÁGUA

1.3.3.1. COAGULAÇÃO E FLOTAÇÃO

O processo de coagulação é realizado por meio da adição de cloreto férrico e tem a finalidade transformar as impurezas da água que se encontram em suspensão fina em estado coloidal.

Inicialmente, são adicionados no canal de entrada da ETA a solução de cal e o cloreto férrico. Em seguida a água é encaminhada para o tanque de pré-floculação para que o coagulante e a cal se misturem uniformemente no líquido, agindo assim de uma forma homogênea e efetiva.

Na floculação, a água é submetida à agitação mecânica para possibilitar que os flocos se agreguem com os sólidos em suspensão, permitindo assim uma decantação mais rápida.

1.3.3.2. DECANTAÇÃO

A etapa de decantação consiste na remoção de partículas em suspensão mais densas que a água por ação da gravidade.

Para uma maior eficiência, o percurso da água floculada para os decantadores deve ser o menor possível e em condições que evitem a quebra dos flocos ou que impeçam a sedimentação das partículas.

As partículas mais densas que a água irão se depositar no fundo do decantador.



1.3.3.3. FILTRAGEM

A filtração é a retenção de partículas sólidas por meio de membranas ou leitos porosos. As Estações de Tratamento de Água utilizam filtros de carvão ativo, areia e cascalho. Para o funcionamento dos filtros é necessária a realização de dois controles:

- a) Controle do nível de água;
- b) Controle da vazão de entrada de água decantada para os filtros e saída de água filtrada.

As ETAs possuem filtros rápidos que funcionam por ação da gravidade e sob pressão. São lavados a contracorrente (inversão de fluxo) com uma vazão capaz de assegurar uma expansão adequada para o meio filtrante.

1.3.3.4. FLUORETAÇÃO E CLORAÇÃO

A cloração consiste na desinfecção das águas através da utilização de cloro gasoso (ETAs) ou hipoclorito de sódio (poços).

A fluoretação é realizada visando proporcionar uma medida segura e econômica de auxiliar na prevenção da cárie infantil. Nas ETAs e nos poços artesianos é utilizado o flúor sob a forma de ácido fluossilícico. As dosagens de cloro e flúor utilizados para o tratamento da água seguem as normas convencionais dos padrões de potabilidade ^[38].



1.4. AMOSTRAGEM

Antes de qualquer programa de monitoramento ambiental, deve-se desenvolver uma amostragem adequada ao objetivo de uma determinada análise.

O objetivo de uma análise é determinar a qualidade ou composição de um material; para que os resultados analíticos tenham validade (ou significado), tornando-se essencial adotar procedimentos adequados de amostragem. A amostragem é o processo de extrair uma grande quantidade de material de uma pequena porção que seja realmente representativa da composição de todo o material ^[39].

Os métodos de amostragem podem ser classificados em três grupos principais:

1. aqueles em que todo material é examinado;
2. a amostragem arbitrária, numa base *ad hoc*;
3. métodos em que parcelas do material são selecionadas com base em probabilidades estatísticas.

O procedimento (1) é normalmente impraticável, pois a maioria dos métodos empregados é destrutiva em qualquer caso e, a quantidade de material a ser examinado pode ser excessiva.

A amostragem (2) é completamente não-científica e pode levar à tomada de decisões com informações inadequadas. Neste caso, como a coleta é inteiramente arbitrária, é impossível qualquer forma real de controle ou de supervisão analíticos.



Em face destas razões, a única base confiável para a amostragem deve ser uma base matemática, com a adoção de probabilidades estatísticas. Isto significa que, embora nem todos os itens ou nem todas as partes da amostra sejam analisados, as limitações da escolha são cuidadosamente calculadas e conhecidas previamente.

Após o cálculo de margem de variação aceitável, deve-se seguir um plano de amostragem (protocolos pré-estabelecidos que variam conforme o tipo de amostra e analito), de acordo com as etapas:

- Justificativa da estratégia de amostragem;
- Descrição adequada da localização do sítio de amostragem ;
- Descrição adequada do tempo (horário) e frequência de amostragem;
- Descrição do método de amostragem;
- Tamanho das amostras;
- Informação adicional (por exemplo, condições climáticas)
- Condições de armazenamento e transporte.

Para água de rio, deve-se levar em consideração alguns parâmetros tais como: vazão do rio; profundidade; precipitação durante o período avaliado; pH e



1.5. DETERMINAÇÃO DE BISFENOL A

1.5.1. ENSAIOS BIOLÓGICOS

Destacam-se principalmente os bioensaios *in vivo* feitos com algumas espécies de peixes, com a utilização da vitelogenina (VTG), uma lipoproteína complexa que desempenha um importante papel no sistema reprodutivo de vertebrados ovíparos fêmeas. É sintetizada no fígado, regulada por estrogênio e transportada através do sangue para os ovários, onde são incorporados no desenvolvimento dos óvulos. De um modo geral, o gene da VTG também está presente em organismos machos, mas sob condições normais não é expressivo, possivelmente, pela baixa concentração de estrogênio no sangue. Desta forma, o aumento de VTG no plasma de um organismo é considerada uma evidência da exposição a substâncias com atividade estrogênica ^[42-44].

Outros métodos biológicos como as *linhas celulares* e os ensaios de DNA, são igualmente apontados na literatura como alternativas ao monitoramento de atividade xeno-estrogênica (incluindo o BPA) em amostras ambientais, embora recentemente os biomarcadores parecem ser a alternativa mais promissora ^[44].



1.5.2. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

Em relação ao tratamento das amostras, a extração em fase sólida (SPE) é a técnica mais reportada com a utilização de cartuchos C₁₈ (grupo octadecil) e de poliestireno-divinilbenzeno (PSDVB) para a extração do BPA, sendo os últimos encontrados em artigos mais recentes. O volume de amostra varia de 500 mL a 1L. Os eluentes mais encontrados na literatura para SPE são: metanol, acetato de etila, acetona e diclorometano. Ainda em relação à extração, a micro-extração em fase sólida (SPME) e *stir-bar sorptive extraction* (SBSE) vêm ganhando cada vez mais espaço na literatura científica conforme apresentadas na Tabela 4.

O método de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS) é o mais comumente utilizado para a determinação de BPA. A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) também tem sido muito utilizada, onde o BPA pode ser detectado por ultra-violeta (UVD), fluorescência (FLU) e detecção eletroquímica (ECD) devido aos dois grupos hidroxila-fenólicos presentes na estrutura. Artigos mais recentes têm demonstrado uma maior utilização de LC/MS. As colunas cromatográficas mais usuais para a análise de BPA em GC: (30 m x 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme - 5% difenil; 95% dimetilpolisiloxano), gás de arraste: He; volume de injeção: 2 µL [4,45-50]; para HPLC, coluna C₁₈ e a fase móvel mais reportada é água/acetonitrila, tanto em modo gradiente quanto em modo isocrático (sendo que neste modo, maior porcentagem para água); volume de injeção: 10 e 20 µL [51-54]. Ainda no HPLC, os comprimentos de onda mais encontrados para o detector de fluorescência para excitação (λ_{exc}) variam de : 245 a 285 nm e os de emissão



(λ_{em}): 300 a 330 nm ^[55,56]. Os fluxos mais encontrados para GC e HPLC estão



Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve ser submetido a uma avaliação denominada de validação. Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que o método e o sistema são adequados para o uso desejado ^[75].

No Brasil existem duas agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial).

Em 1987, o FDA, por meio do “Guideline for Submitting Sample and Analytical Data”, reconheceu as especificações, descritas a seguir, como as principais fases da validação de métodos. Esses termos também são conhecidos como parâmetros de desempenho analítico, características de desempenho ou figuras analíticas de mérito ^[76].

1.6.1. PARÂMETROS DE DESEMPENHO ANALÍTICO

1.6.1.1. EXATIDÃO

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência. A exatidão é expressa como o percentual de resposta obtido através do ensaio de uma quantidade conhecida da substância em exame incorporada em um meio de composição definida, geralmente padrões certificados.



Para avaliar a exatidão, as diretrizes da ICH (International Conference on Harmonization) em metodologia recomendam a coleta de dados referentes a um mínimo de nove determinações sobre um mínimo de três diferentes concentrações cobrindo a variação especificada (por exemplo, três concentrações, análise em triplicata de cada). Os dados obtidos devem ser registrados como o percentual de resposta da quantidade conhecida adicionada ou como a diferença entre a média e o valor teórico com os respectivos intervalos de confiança.

1.6.1.2. PRECISÃO

A precisão representa o grau de repetitividade entre os resultados de análises individuais quando o procedimento é aplicado diversas vezes em uma mesma amostra homogênea, em idênticas condições de teste. Normalmente é expressa através do coeficiente de variação (CV) em um número estatisticamente significativo de amostras.

De acordo com a ICH, a precisão deve ser medida em três diferentes níveis:

- Repetitividade;
- Precisão intermediária;
- Reprodutibilidade.

A repetitividade corresponde aos resultados obtidos através de várias reproduções de um método, nas mesmas condições, em curto intervalo de tempo (precisão entre ensaios). Essa determinação deve ser feita a partir de um mínimo



de nove determinações cobrindo o limite especificado do procedimento (ex: três níveis, três repetições cada um), ou a partir de um mínimo de seis determinações a 100% do teste ou a concentração teórica. A composição teórica é definida como a concentração do composto de interesse descrita no método.

A precisão intermediária expressa o efeito das variações dentro do próprio laboratório devido a eventos como diferentes dias de análise, analistas, equipamentos, etc.

A reprodutibilidade refere-se aos resultados dos estudos de colaboração entre laboratórios.

1.6.1.3. LIMITE DE DETECÇÃO

O limite de detecção (LD) é a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas, dentro de um certo limite de confiabilidade. O LD pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído, normalmente três vezes, e o método baseado em parâmetros da curva analítica.

1.6.1.4. LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito, em uma amostra que pode ser quantificado com exatidão e precisão aceitáveis, sob as condições experimentais adotadas, dentro de um limite de confiança pré-



determinado (em geral 95%) ^[77]. O LQ assim como o LD também pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído, normalmente dez vezes, e o método baseado em parâmetros da curva analítica.

1.6.1.5. LINEARIDADE E FAIXA LINEAR

A linearidade corresponde à capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame dentro de uma determinada variação. A linearidade está normalmente relacionada com a variação da inclinação da linha de regressão. A faixa linear corresponde ao intervalo entre o valor superior e inferior da substância em exame, que atenda os requisitos de precisão, exatidão e linearidade através do método. A faixa de variação é normalmente expressa nas mesmas unidades dos resultados obtidos pelo método em questão.

1.6.1.6. ROBUSTEZ

A robustez corresponde à capacidade de um método de não ser afetado por uma pequena modificação em seus parâmetros. A robustez do método é avaliada através de parâmetros modificados como a composição da fase móvel, pH, força iônica, temperatura, etc., e a respectiva determinação do seu efeito (se houver) sobre os resultados a serem obtidos com a metodologia.



A Tabela 5 apresenta as agências reguladoras do Brasil (ANVISA e INMETRO) e internacionais (USP, ICH e IUPAC) e os respectivos parâmetros de desempenho analítico utilizados pelas mesmas [77-82].

Tabela 5. Agências Reguladoras e respectivos Parâmetros de Desempenho Analítico

INMETRO	ANVISA, USP, ICH	IUPAC
Especificidade/Seletividade	Especificidade/Seletividade	Seletividade
Faixa de trabalho e Faixa linear de trabalho	Intervalo	Intervalo
Linearidade	Linearidade	Linearidade e Calibração
Limite de Detecção	Limite de Detecção	Limite de Detecção
Limite de Quantificação	Limite de Quantificação	Limite de Quantificação ou Limite de Determinação
Sensibilidade (inclinação da curva)	-	Sensibilidade (inclinação da curva)
Exatidão e tendência	Exatidão	Exatidão
Precisão	Precisão	Precisão
Repetitividade	Repetibilidade	Repetitividade
Precisão Intermediária	Precisão Intermediária	Precisão Intermediária
Reprodutibilidade	Reprodutibilidade	Reprodutibilidade
Robustez	Robustez	Robustez
Incerteza da Medição	-	Incerteza da Medição

Entre os critérios descritos anteriormente, a exatidão e a precisão são os principais critérios considerados para o propósito da validação de um método analítico. Quatro procedimentos têm sido utilizados para o estudo da exatidão e precisão de um método, sendo baseados em:

- uso de material de referência certificado;



- ☑ comparação do método proposto com o de referência;
- ☑ uso de ensaios de recuperação na matriz;
- ☑ estudos colaborativos.

Os materiais de referência certificados, quando disponíveis, são os materiais de controle preferidos, pois eles são reconhecidos diretamente por padrões ou unidades internacionais. O procedimento consiste em analisar um número suficiente de materiais de referência e comparar os resultados com os valores certificados. Entretanto, existem limitações como seu elevado custo, pequenas quantidades que podem ser adquiridas e estreita faixa de cobertura de matrizes e analitos.

A eficiência de um método recém desenvolvido pode ser avaliada pela comparação de resultados obtidos por ele com os fornecidos por um método que se conhece a exatidão e a precisão, mas nem sempre se encontra um método de referência preexistente. O uso de estudos colaborativos para controle metodológico de desvios ou tendências nos erros sistemáticos é um tópico muito importante. Este estudo implica na aceitação de um considerável número de laboratórios em empenhar-se no desenvolvimento do método, o que nem sempre é possível.

Estudos de recuperação utilizam amostras fortificadas com os analitos de interesse, onde a adição é executada na faixa apropriada dos mesmos. Alguns analitos quando incorporados naturalmente na matriz são quimicamente ligados aos constituintes da mesma, desta forma, a simples adição na matriz não refletirá o que acontece na prática. É recomendável que o analito seja adicionado na



matriz e então, deixado em contato por algumas horas antes da aplicação do método analítico. Isso permite que a interação analito-matriz ocorra o mais naturalmente possível. A concentração do analito adicionada em uma amostra controle (neste trabalho foi designada por testemunha) corresponde ao nível de fortificação.

É importante considerar que a validação de métodos analíticos constitui uma etapa extremamente relevante do desenvolvimento do método. A investigação deve sempre incluir a validação do método desenvolvido e não apenas a sua otimização, principalmente quando envolve sua aplicação em um determinado tipo de matriz e não apenas estudos com soluções padrão ^[83, 84].



2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo desenvolver um método simples, rápido e eficiente para determinação de bisfenol A em água, utilizando a extração em fase sólida “off line” e, posterior análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência, avaliando a eficiência da metodologia através da precisão (repetitividade e precisão intermediária), recuperação, linearidade e detectabilidade (limite de detecção e quantificação).



3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.1. MATERIAIS

3.1.1.1. REAGENTES, SOLVENTES E PADRÃO

- Padrão BPA (99%) - Sigma-Aldrich BRASIL Ltda;
- Acetonitrila (grau HPLC, Mallinckrodt);
- Metanol (grau HPLC, Mallinckrodt);
- Acetato de etila (grau HPLC, Mallinckrodt);
- Acetona (grau HPLC, Mallinckrodt);
- Água ultra-pura (Milli-Q, Sistema Millipore);
- Extran Alcalino (Merck).

3.1.1.2. GÁS UTILIZADO PARA PRÉ-CONCENTRAR AMOSTRAS

- Nitrogênio gasoso, 99,99% de pureza, super seco, Aga.

3.1.1.3. COLUNA CROMATOGRÁFICA

- Coluna Cromatográfica Analítica Gemini C₁₈ - Phenomenex® (250 x 4,6mm e 5 μm);
- Pré-coluna (ou coluna de guarda) : C₁₈ - Phenomenex® (4,0 x 3,0 mm).



3.1.1.4. EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

- Cartucho Strata X, Phenomenex® de PSDVB (poliestireno-divinilbenzeno);
200 mg de adsorvente e 6 mL de reservatório.

3.1.2. EQUIPAMENTOS DE BANCADA E ELETRÔNICOS

3.1.2.1. EQUIPAMENTOS DE BANCADA

- Bastões de vidro;
- Espátulas de inox;
- Provetas (10 mL; 20 mL e 1000mL);
- Balões volumétricos (10 e 100 mL);
- Pipetas volumétricas (1, 2, 4 e 5 mL);
- Pipetas de Pasteur;
- Béqueres (10 e 200 mL);
- Suporte universal;
- Garras;
- Vials âmbar (2 mL);
- Seringas de vidro (5 mL);
- Conjunto de filtração;
- Frascos âmbar (4 L);
- Funil de Vidro (500 mL);
- filtros de TEFLON PTFE (politetrafluoretileno - 0,45 µm; 15 mm);
- filtros de fibra de vidro GF/C (0,47mm e 0,7 µm).



3.1.2.2. EQUIPAMENTOS ELETRÔNICOS

- Balança Mettler Toledo AG245;
- pHmêtro Corning 430;
- Manifold Waters;
- Bomba de vácuo FANEM – Diapump;
- Ultrassom UNIQUE- T50220;
- Espectrofotômetro UV/VIS Perkin Elmer Lambda 14 P;
- Espectrofluorímetro Hitachi F-4500;
- HPLC Pump 501 e detector UV 486 Waters;
- HPLC Autosampler 4000 e detector de fluorescência 360 Varian Pro Star;
- Workstation Chromatography (versão 5.3-Varian).

3.1.3. SOLUÇÕES PADRÃO

Pesou-se 20,0 mg de BPA e transferiu-se quantitativamente com acetonitrila (ACN) para um balão volumétrico, completando-se o volume até 100 mL ($C_{\text{solução estoque do BPA}} = 200 \mu\text{g mL}^{-1}$).

As soluções de trabalho foram preparadas, individualmente, a partir de diluições da solução estoque, em concentrações de 5, 10, 20, 30, 50, 100, 200, 300, 500, 1.000, 2.000, 3.000, 4.000, 5.000 e 10.000 ng mL^{-1} .

As soluções estoque e de trabalho foram armazenadas em frascos âmbar e mantidas sob refrigeração (-15°C).



A validade (armazenamento e estabilidade) das soluções foi testada ao longo de 3 meses com injeções em triplicata no equipamento HPLC/FLU.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Determinou-se no espectrofotômetro (UV-VIS), o comprimento de onda de máxima absorção para o BPA, cujo valor foi utilizado posteriormente no HPLC/UV.

No espectrofluorímetro, foi determinado o par de comprimento de onda (excitação /emissão) onde ocorreu a maior fluorescência do padrão, os quais foram então aplicados ao HPLC/FLU.

Após a obtenção dos espectros UV e de fluorescência do BPA, testou-se a composição de fase móvel, volume de injeção e vazão reportadas na literatura, onde se obteve as seguintes condições otimizadas:

- Fase móvel (H₂O/ACN) = 50:50;
- volume de injeção= 20 µL ;
- vazão= 1 mL min⁻¹.

Uma vez otimizadas as condições cromatográficas, fez-se uma curva analítica para cada sistema, comparando-se os limites de detecção e quantificação, bem como o coeficiente de variação da resposta para cada sistema analítico. Para o sistema escolhido, traçou-se uma curva de linearidade.



3.2.2. DETERMINAÇÃO DO LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS EQUIPAMENTOS

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) dos equipamentos para o padrão estudado foram determinados conforme o método recomendado pela IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) de acordo com as equações 1 e 2 ^[77].

$$LD = 3 \times Sd/b \text{ (eq. 1)}$$

$$LQ = 3 \times LD \text{ (eq. 2)}$$

onde “b” é o coeficiente angular e “Sd” o desvio padrão da curva analítica do padrão estudado.

Para a determinação dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) dos equipamentos foram construídas curvas analíticas com soluções nas concentrações de 20 a 500 ng mL⁻¹ (HPLC/FLU) e 200 a 3000 ng mL⁻¹ (HPLC/UV), sendo obtidos os parâmetros da equação da reta, os quais foram substituídos nas equações 1 e 2 para a obtenção dos limites de detecção e quantificação dos instrumentos.

3.2.3. DETERMINAÇÃO DA LINEARIDADE DE RESPOSTA DO DETECTOR

A região linear de resposta do detector foi determinada por injeções no HPLC/FLU, com condições operacionais já otimizadas. Soluções padrão de concentrações variando entre 20 e 500 ng mL⁻¹ foram injetadas no mínimo três vezes. Quando os resultados (tempo de retenção e resposta, expresso em área do



pico cromatográfico) de uma solução diferiram mais de 10%, fazia-se uma nova injeção. O gráfico de linearidade foi construído relacionando-se os valores de concentração das soluções no eixo das abscissas com a área do pico cromatográfico (sinal do FLU) dividido pela respectiva concentração daquela área, no eixo das ordenadas.

3.3. TRATAMENTO DAS AMOSTRAS

3.3.1. EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

Adaptou-se a metodologia de LIU *et al.* ^[47], utilizando-se cartucho STRATA X, conforme o fluxograma a seguir, onde as etapas com um asterisco indicam a modificação do método:

Condicionamento

- 5 mL de acetato de etila;
- 5 mL de metanol passados sob vácuo baixo. Em seguida, deixou-se 5 min em repouso:



3.3.2. AVALIAÇÃO DO MÉTODO

Geralmente, a validação do método analítico proposto ocorre por meio de ensaios de recuperação, uma vez que esse procedimento gera todas as informações necessárias para a avaliação do procedimento analítico. A exatidão é a concordância entre o valor real do analito na amostra e o estimado pelo processo analítico, e a precisão é o parâmetro que avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas em uma mesma amostra^[76-78].

3.3.2.1. FORTIFICAÇÃO

As fortificações foram feitas em concentrações bem próximas ao limite de quantificação (30 ng mL^{-1}), denominado como nível baixo, que corresponde a $0,06 \text{ ng mL}^{-1}$ na amostra fortificada; (100 ng mL^{-1}) ou nível médio ($0,2 \text{ ng mL}^{-1}$) e 300 ng mL^{-1} ou nível alto ($0,6 \text{ ng mL}^{-1}$) de acordo com a Tabela 6. Porém, antes de se fazer as fortificações dos níveis médio e alto, testou-se 3 eluentes diferentes (acetato de etila, acetona e metanol) na extração do nível baixo ($0,06 \text{ ng mL}^{-1}$). As etapas a seguir descrevem o procedimento desde a coleta da água de torneira até a última etapa da fortificação:

- ➔ antes de se coletar a água de torneira do Instituto de Química (IQ)/UNESP, deixou-se a torneira aberta cerca de 5 minutos;
- ➔ após este tempo, verificou-se a temperatura e o pH. Em seguida, coletou-se 2,5 L de água em um frasco de vidro âmbar (previamente condicionado com a matriz) conforme a Figura 8;



- posteriormente, fez-se a fortificação, adicionando-se 5 mL da solução padrão de 30 ng mL^{-1} . Em seguida, agitou-se vigorosamente cerca de 15 minutos e então, a amostra fortificada foi armazenada a -15°C , ao abrigo da luz, por aproximadamente 4 a 6 horas.

Tabela 6. Concentração do padrão na curva e na amostra fortificada

Concentração na curva (ng mL^{-1})	Concentração na amostra (ng mL^{-1})
30 (*)	0,06
100 (**)	0,2
300 (***)	0,6

(*) valor próximo ao limite de detecção do equipamento;

(**) aproximadamente 3 x o valor próximo ao LD do equipamento;

(***) 10 x o valor próximo ao LD do equipamento.



Para o cálculo dos níveis baixo, médio e alto, utilizou-se a equação 3:

$$\text{Nível} = \frac{\text{Concentração da solução padrão adicionada}}{\text{Fator de pré-concentração}} \quad (\text{eq.3})$$

3.3.2.2. ESTUDO DE RECUPERAÇÃO

Primeiramente, fez-se a extração do branco de acordo com a metodologia adaptada descrita na seção 3.3.1. (todas as etapas exceto a passagem de amostra), seguida da testemunha (todas as etapas exceto a adição do analito na amostra) e por último, fez-se a extração da água fortificada (todas as etapas inclusive a adição de padrão na amostra) em quadruplicata.

Neste estudo de recuperação, fez-se a extração em quadruplicata, testando-se 3 eluentes diferentes (acetato de etila, acetona e metanol) para a fortificação feita com solução de 30 ng mL^{-1} a fim de se verificar com qual solvente obtinham-se as melhores recuperações. Uma vez escolhido o eluente, prosseguiu-se o estudo de recuperação com outros dois níveis (100 ng e 300 ng mL^{-1}) de solução padrão de BPA. A exatidão e a precisão dos resultados foram determinadas efetuando-se os cálculos de BPA recuperado em água e o respectivo coeficiente de variação.

A recuperação (R) foi calculada através da equação 4. A Figura 9 representa o sistema de SPE utilizado neste trabalho.

$$R = \text{massa obtida} \times 100 / \text{massa esperada} \quad (\text{eq. 4})$$

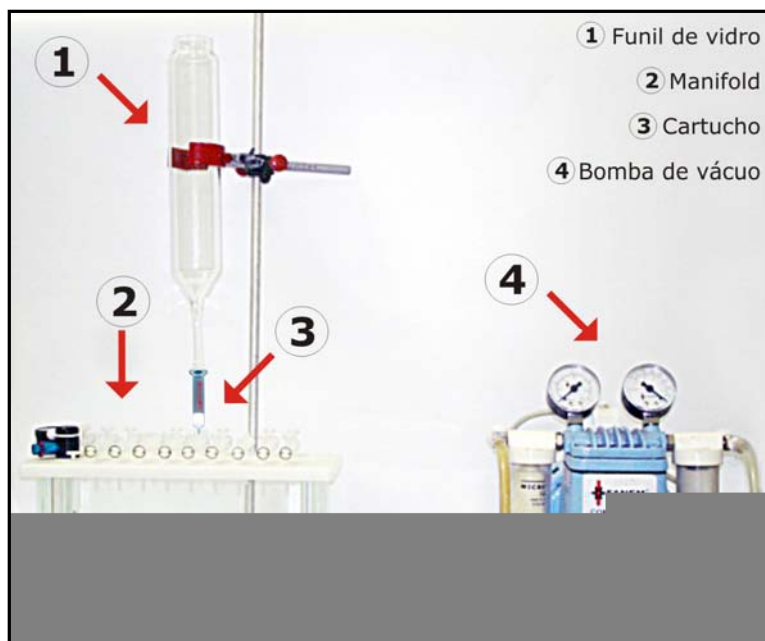


Figura 9. Sistema de Extração em Fase Sólida

3.3.2.3. AMOSTRA REAL

As amostras de água bruta foram coletadas dos tanques de entrada da ETA - FONTE, onde há a junção das águas dos rios Ribeirão das Cruzes e Anhumas (Figura 10), durante uma semana, em três dias diferentes às 09:30 am. Anteriormente à coleta, condicionou-se tanto o frasco coletor (Figura 11) quanto o frasco de vidro âmbar (Figura 8) com a amostra a ser coletada. Após o condicionamento dos materiais, coletou-se aproximadamente 4 L de água bruta (Figura 12). Transportou-se a água coletada até o local onde se fez a extração sob temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Estas amostras foram extraídas sem a adição do analito (verificação da presença ou não do BPA) e com a adição do mesmo ($n=3$) a fim de se verificar o LQ do método. Porém, antes de se iniciar a extração em fase sólida, filtrou-se a água de entrada da ETA com filtro de fibra de



vidro ($0,7 \mu\text{m}$), previamente calcinado (200°C ; 4 h; guardados em papel alumínio ao abrigo da luz), utilizando o conjunto de filtração apresentado na Figura 13, a fim de remover as partículas sólidas.



Figura 10. Adutoras dos Rios Ribeirão das Cruzes e Anhumas

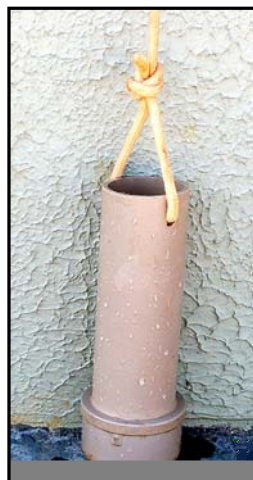


Figura 11. Frasco Coletor (500 mL)



Figura 12. Coleta da água bruta

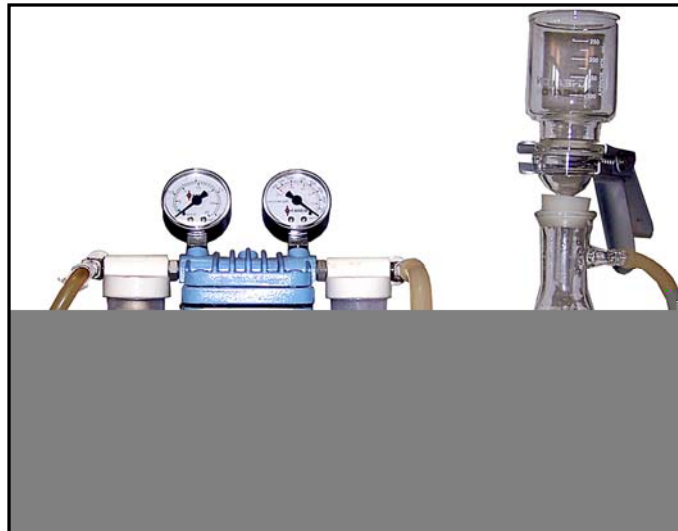


Figura 13. Sistema de Filtração

As amostras de água potável foram coletadas diretamente do reservatório 2 (antes da mistura da água de saída da ETA com a água de poço - ilustrado na Figura 14) da mesma forma como se amostrou a água bruta a fim de se verificar a eficiência da remoção de BPA (caso estivesse presente) da ETA Fonte, durante uma semana, em três dias diferentes às 09:30 am. Estas amostras foram extraídas em triplicata.



As extrações sempre foram realizadas num período de 30 a 40 minutos após a coleta.



Figura 14. Reservatório 2 (água potável)

3.4. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

Após a identificação do intervalo de resposta linear do sistema HPLC/FLU, as curvas analíticas (área versus concentração do analito) foram traçadas com o auxílio do programa Origin 7.0, o qual forneceu os coeficientes de correlação das retas obtidas, os coeficientes angulares e lineares e as respectivas estimativas de desvio padrão.

Para o cálculo do limite de detecção do método (LD^*) e do limite de quantificação do método (LQ^*), dividiu-se o LD e LQ do instrumento pelo fator de pré-concentração utilizado na extração, uma vez que os valores obtidos no estudo



de recuperação situaram-se muito próximos a 100%. A quantificação do BPA foi efetuada de acordo com o método do padrão externo.

As injeções dos extratos do branco, testemunha e água fortificada e soluções padrão foram feitas no mesmo dia e seqüencialmente.

3.5. LIMPEZA DA VIDRARIA

O material utilizado foi imerso em solução de Extran 20% e, após aproximadamente 12 horas foi enxaguado em água corrente. A secagem da vidraria e de outros materiais não volumétricos foi feita em estufa à temperatura de aproximadamente 130°C e do material volumétrico à temperatura ambiente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. ANÁLISE NO ESPECTROFOTÔMETRO (UV-Vis)

Fez-se uma varredura de uma solução padrão diluída de BPA de 200 a 400 nm no espectrofotômetro, onde verificou-se que a maior absorção do BPA no UV-Vis ocorreu no comprimento de onda de 228 nm conforme a Figura 15.

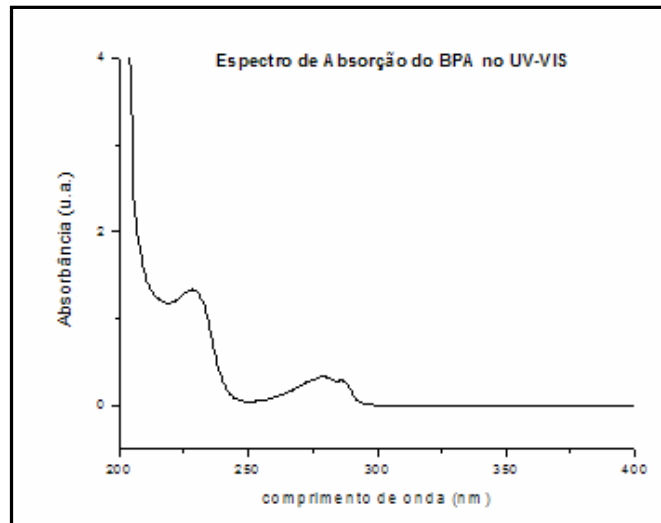


Figura 15. Espectro de Absorção do BPA no UV-Vis

4.1.1. ANÁLISE NO HPLC/UV

Com o resultado obtido no espectrofotômetro (UV-VIS), fixou-se o comprimento de onda em 228 nm no HPLC/UV e fez-se uma curva analítica com soluções padrão de trabalho variando entre 200 e 3.000 ng mL⁻¹ (injeções em triplicatas), onde obteve-se um CV=2,4%, conforme a Figura 16.

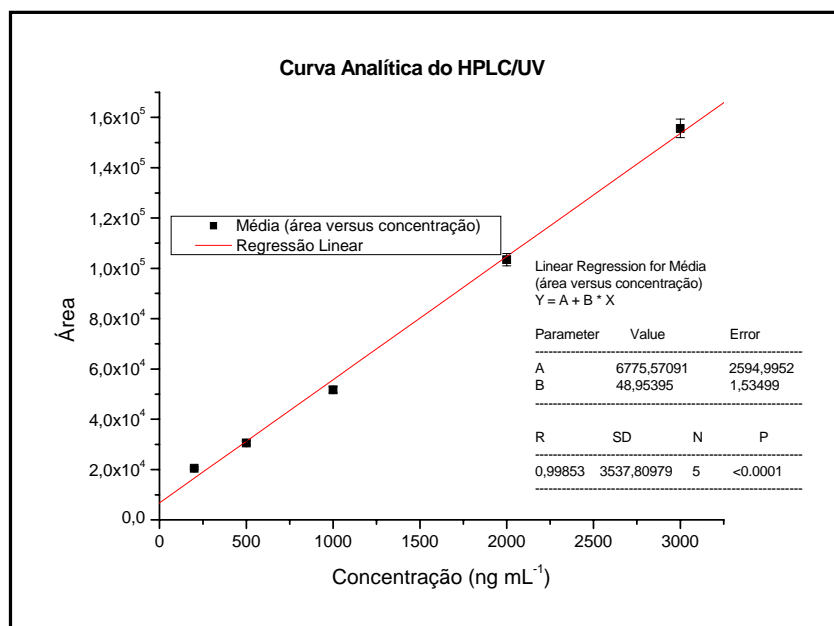


Figura 16. Curva Analítica HPLC/UV



A Figura 17 representa um cromatograma de uma solução $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ analisada no HPLC/UV, onde obteve-se a área do pico cromatográfico do padrão num tempo de retenção igual a 7,6 minutos.

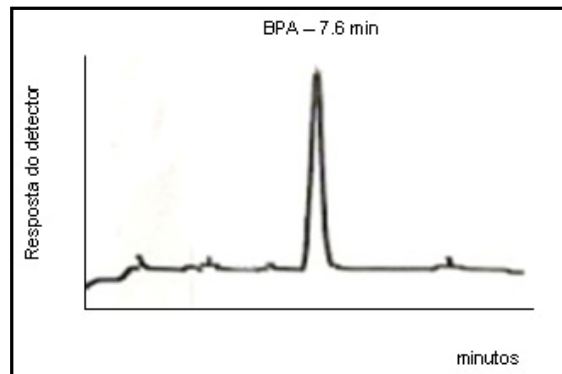


Figura 17. Cromatograma de uma solução de trabalho ($3 \mu\text{g mL}^{-1}$)

4.2. ANÁLISE NO ESPECTROFLUORÍMETRO

Com uma solução diluída, fez-se uma varredura de 220 a 350 nm para o comprimento de onda de excitação e, de 250 a 490 nm para a emissão, verificando-se, portanto, que o par excitação/emissão onde ocorreu a maior fluorescência do BPA foi 280/300 nm respectivamente, conforme a Figura 18.

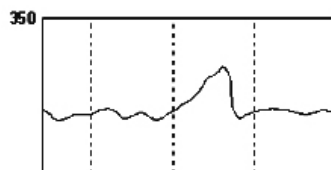


Figura 18. Espectro de Fluorescência 3D do BPA



A Figura 19 representa o espectro de fluorescência 3D do BPA plotado no programa matemático Origin 7.0 com a finalidade de facilitar a visualização dos comprimentos de onda de excitação/emissão.

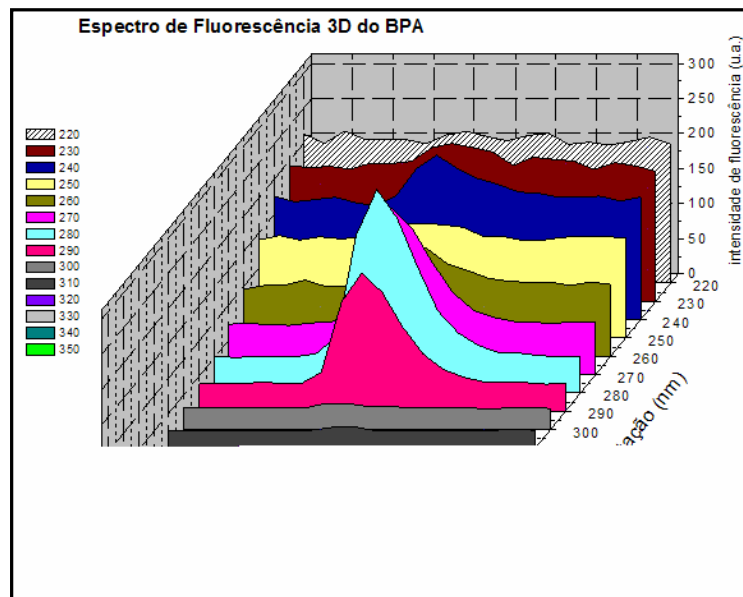


Figura 19. Espectro de Fluorescência 3D do BPA plotado no Origin

4.2.1. ANÁLISE NO HPLC/FLU

Com os valores de comprimento de onda de excitação e emissão obtidos no espectrofluorímetro, fez-se a análise no HPLC/FLU.

Traçou-se uma curva analítica com soluções padrão de trabalho variando entre 20 e 500 ng mL⁻¹ (injeções em triplicatas), onde obteve-se, após a regressão linear, um CV= 1,5% de acordo com a Figura 20.

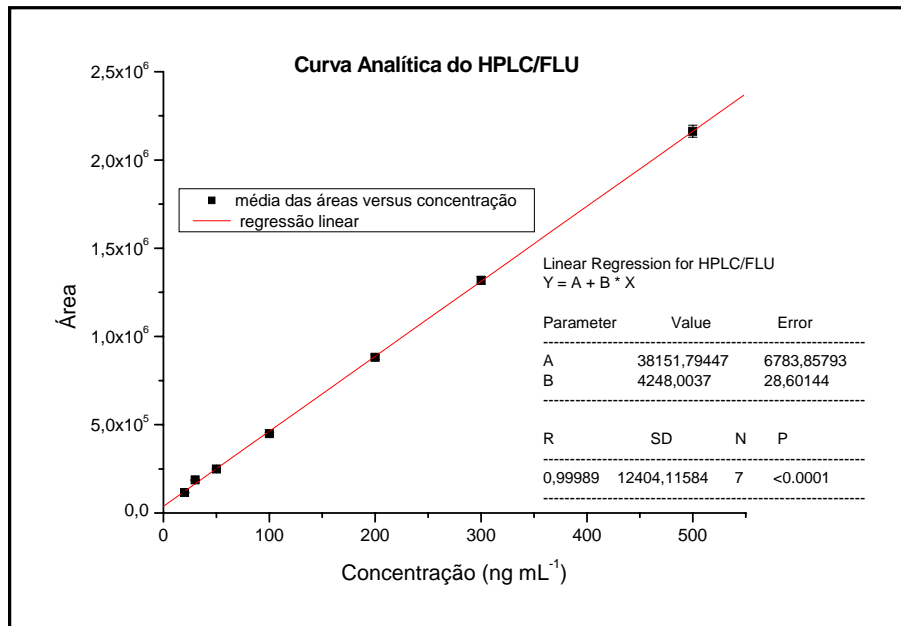


Figura 20. Curva Analítica HPLC/FLU

A Figura 21 representa os cromatogramas de solução padrão de trabalho (500 ng mL^{-1}) injetada em triplicata, onde verificou-se que a média do tempo de retenção do analito nas condições cromatográficas otimizadas anteriormente é 7,7 minutos com um CV=5%.

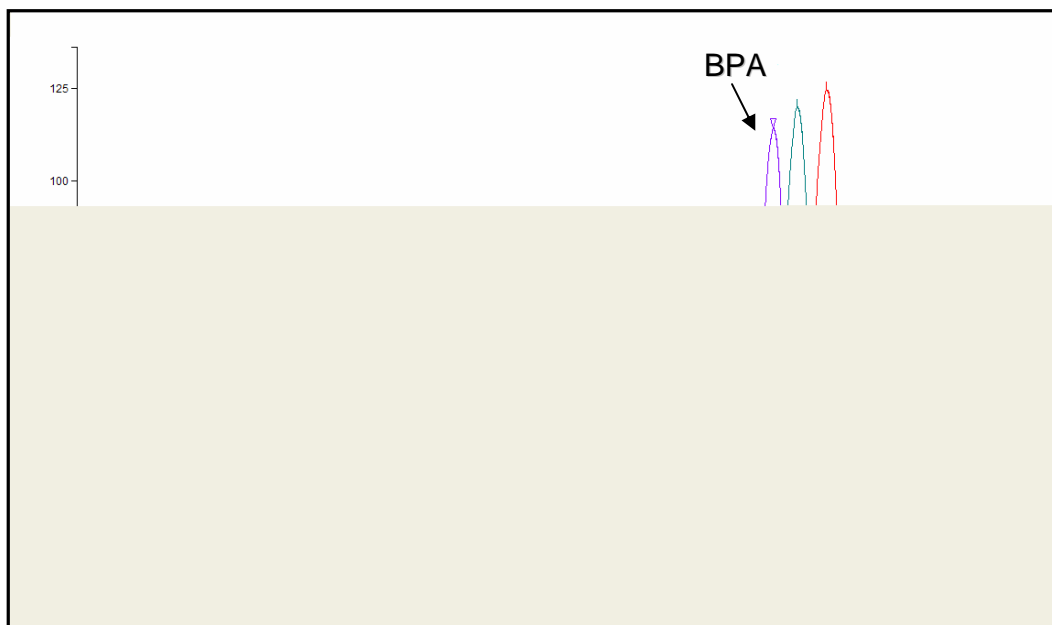


Figura 21. Cromatogramas de uma solução padrão de 500 ng mL^{-1} de BPA



4.3. LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS SISTEMAS ANALÍTICOS UTILIZADOS

O procedimento para a determinação do limite de detecção ($LD = (3 \times Sd)/b$) e do limite de quantificação ($LQ = 3 \times LD$) foi descrito no item 3.2.2.

A Tabela 7 apresenta os limites de detecção e de quantificação dos equipamentos para o padrão estudado, utilizando os dados das curvas analíticas obtidas pelo método do padrão externo.

Tabela 7. Limites de Detecção, Quantificação e Coeficiente de Variação dos Sistemas Estudados

SISTEMA	LD (ng mL ⁻¹)	LQ (ng mL ⁻¹)	CV (%)
HPLC/UV	216,8	650,4	2,4
HPLC/FLU	8,76	26,3	1,5

Comparando-se os dois detectores, verificou-se que o sistema HPLC/FLU é o mais sensível para o desenvolvimento da metodologia proposta conforme demonstrado na Tabela 7.

4.4. LINEARIDADE E FAIXA LINEAR

Calculou-se os valores da mediana (med=4508), mediana superior (limite superior) m.s.=5057 e mediana inferior (limite inferior) m.i.=3959; desvio absoluto da mediana (mad=183); intervalo de confiança (I.C.=549) de acordo com AUGUSTO ^[85], plotando posteriormente a curva de linearidade do detector de fluorescência, considerando-se para este experimento um valor de $k=3$.



De acordo com a Figura 22, verificou-se que a faixa de concentração estudada é linear, pois todos os pontos A/C vs C estão dentro dos limites calculados.

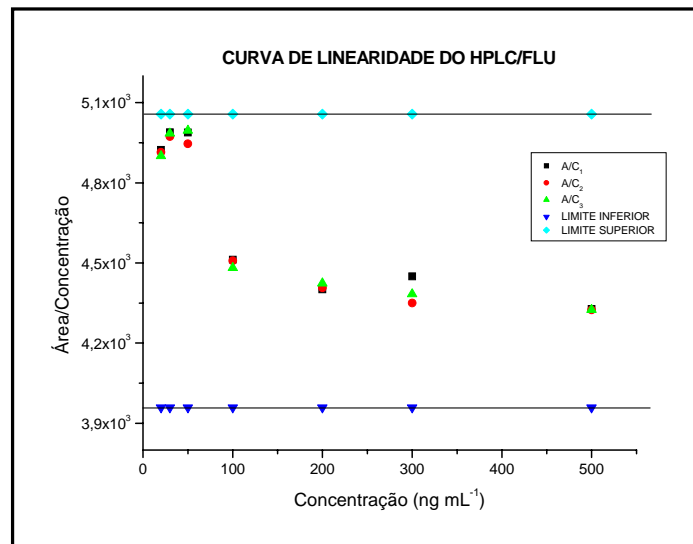


Figura 22. Curva de Linearidade do HPLC/FLU

Uma vez definida a técnica cromatográfica, deu-se continuidade à proposta deste trabalho fazendo-se o estudo de recuperação do analito.

4.5. VALIDAÇÃO DO MÉTODO

4.5.1. ESTUDO DE RECUPERAÇÃO

Quando se coletou a amostra (água de torneira), mediu-se o pH e a temperatura da mesma (pH variou entre 6,80 e 6,97; a temperatura variou entre 25 e 27°C).

Fez-se a extração seqüencial do branco, testemunha e água fortificada em quadruplicata testando acetona, acetato de etila e metanol como eluentes para a



concentração de 30 ng mL^{-1} , obtendo-se os cromatogramas ilustrados nas Figuras 23 a 25 respectivamente e em todos há também comparação com a injeção do padrão na concentração avaliada.

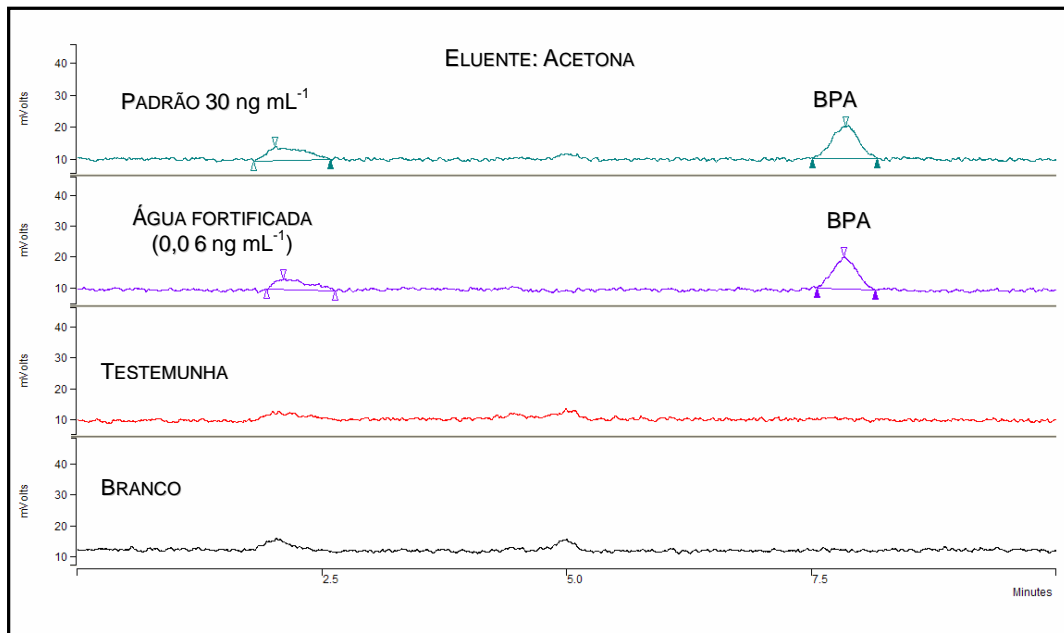


Figura 23. Cromatogramas dos extratos do branco, testemunha, água fortificada e padrão

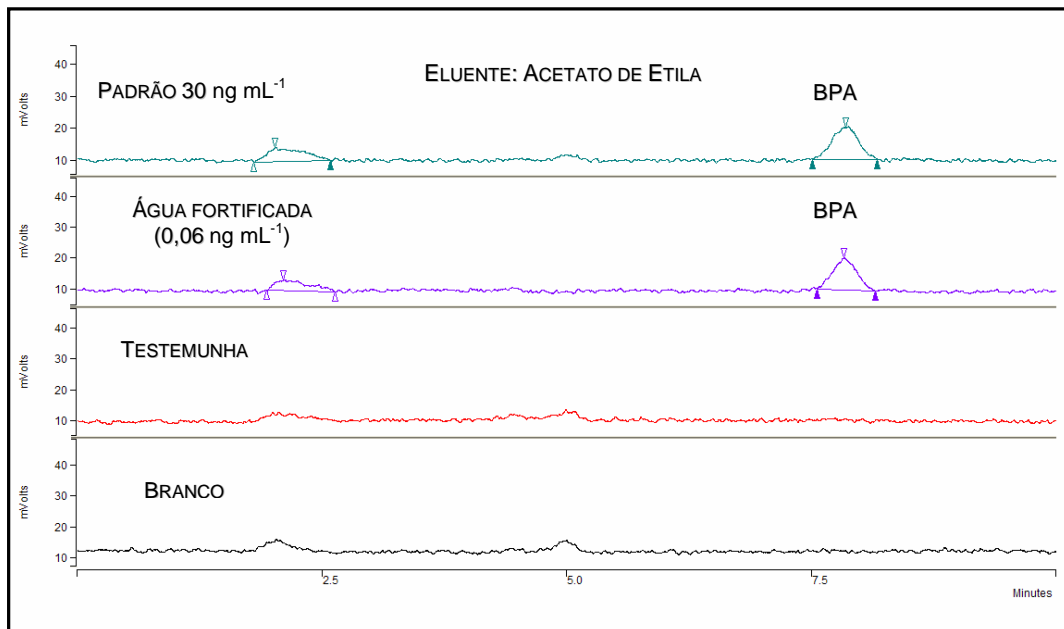


Figura 24. Cromatogramas dos extratos do branco, testemunha, água fortificada e padrão

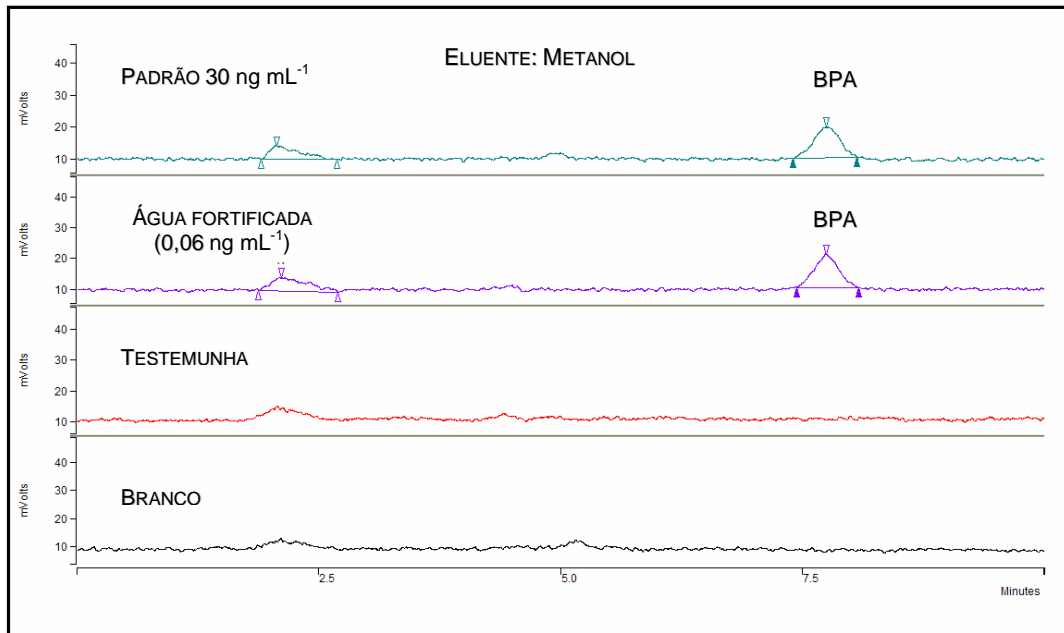


Figura 25. Cromatogramas dos extratos do branco, testemunha, água fortificada e padrão

Analisando-se as Figuras 23 a 25, verificou-se que houve a recuperação do analito no mesmo tempo de retenção do padrão. Em termos de valores recuperados, com o eluente metanol, a recuperação do analito foi de 99,98% (CV=3,9%), já para o eluente acetato de etila, a recuperação foi de 107,62% (CV=6,7) e, para a acetona, obteve-se uma recuperação de 95,21% (CV=5,4%) de acordo com a Tabela 8.

Tabela 8. Comparação entre eluentes através de seus valores de recuperação (R) e Coeficiente de Variação (CV) para amostra de água potável fortificada com 30 ng mL⁻¹

ÁGUA DE TORNEIRA FORTIFICADA (n=4)		
Eluente	R (%)	CV(%)
Acetona	95,21	5,4
Acetato de Etila	107,62	6,7
Metanol	99,98	3,9



Prosseguiu-se a validação com o eluente metanol, fazendo-se a fortificação da água de torneira em mais dois níveis de concentração, conforme representados nas Figuras 26 e 27, onde se verificou uma recuperação de 99,99% para o nível médio ($0,2 \text{ ng mL}^{-1}$) com um $\text{CV}=0,52\%$ e de 100% para o nível alto ($0,6 \text{ ng mL}^{-1}$) com um $\text{CV}=0,30\%$ de acordo com a Tabela 9.

Tabela 9. Níveis de Fortificação da Água de Torneira e respectivos valores de Recuperação (R) e Coeficiente de Variação (CV)

ÁGUA DE TORNEIRA FORTIFICADA (n=4)		
Fortificação (ng mL^{-1})	R(%)	CV (%)
30	99,98	3,9
100	100	0,52
300	100	0,30

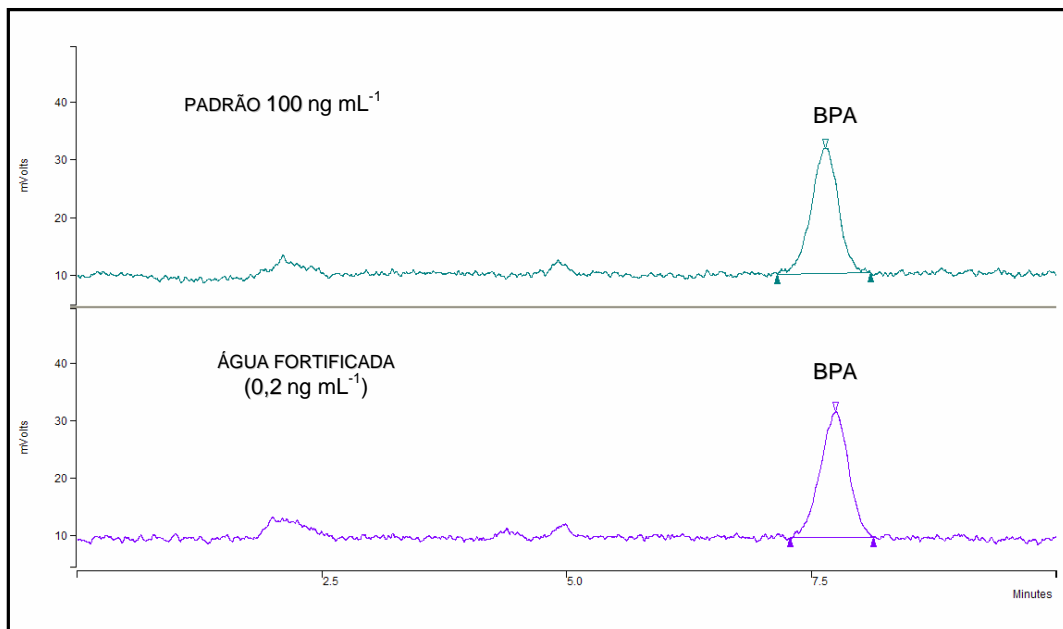


Figura 26. Cromatogramas do extrato da água de torneira fortificada e padrão 100 ng mL^{-1}

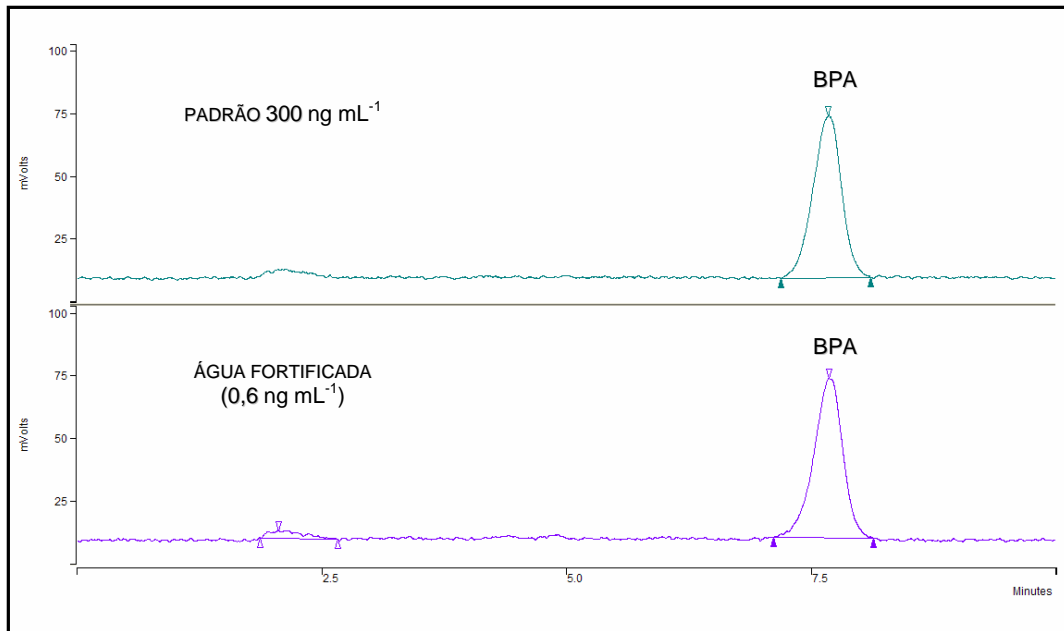


Figura 27. Cromatogramas do extrato da água de torneira fortificada e padrão 300 ng mL⁻¹

A Tabela 10 apresenta os resultados de validação do método desenvolvido para análise de BPA em água, utilizando a SPE e a quantificação por HPLC/FLU.

Tabela 10. Parâmetros de Validação obtidos para o método desenvolvido para a análise de BPA em água, usando SPE com cartucho de PSDVB (n=4) e determinação por HPLC/FLU

composto	Intervalo Linear (ng mL ⁻¹)	LD (ng mL ⁻¹)	LQ (ng mL ⁻¹)	LD* (ng mL ⁻¹)	LQ* (ng mL ⁻¹)	r
Bisfenol A	20-500	8,76	26,3	0,02	0,06	0,9999

* valores obtidos para o método (fator pré-concentração de 500 vezes)



4.6. APLICAÇÃO DO MÉTODO

4.6.1. AMOSTRA REAL

As amostras de água da entrada (água bruta) e de saída (água potável) da ETA - FONTE foram analisadas de acordo com o método validado anteriormente. As Figuras 28 e 29 correspondem aos extratos de água bruta e potável respectivamente em uma das replicatas de um dos dias em que se fez a coleta.

As Tabelas 11 e 12 apresentam as características da água bruta e potável nos dias em que as mesmas foram coletadas.

Tabela 11. Características Físico-Químicas da Água Bruta da ETA-Fonte

ÁGUA BRUTA				
Coleta	pH	Cor	Turbidez	Vazão (L s ⁻¹)
1ª coleta	6,5	93	16	491
2ª coleta	6,6	91	15	460
3ª coleta	6,6	84	18	482

Tabela 12. Características Físico-Químicas da Água Potável da ETA-Fonte

ÁGUA POTÁVEL					
Coleta	pH	Cor	Turbidez	Cloro (ppm)	Flúor (ppm)
1ª coleta	9,0	0,0	0,63	1,20	0,78
2ª coleta	8,7	0,0	0,31	1,24	0,74
3ª coleta	7,8	0,0	0,47	1,25	0,90

De acordo com as Figuras 28 e 29, verificou-se a presença de BPA tanto na água bruta quanto na água potável. Em amostras de água bruta, os valores encontrados de BPA estiveram entre 11,7 e 16,8 ng mL⁻¹. Já em amostras de água potável, os valores estiveram entre 6,2 e 7,3 ng mL⁻¹ nos dias analisados.

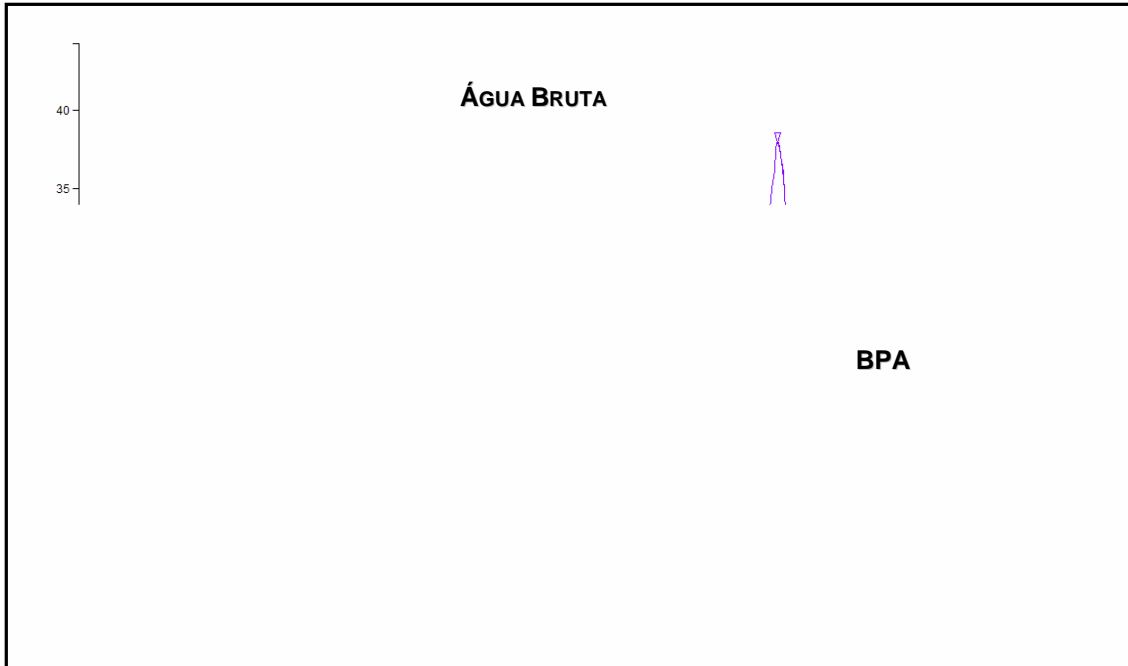


Figura 28. Cromatograma do extrato da água bruta

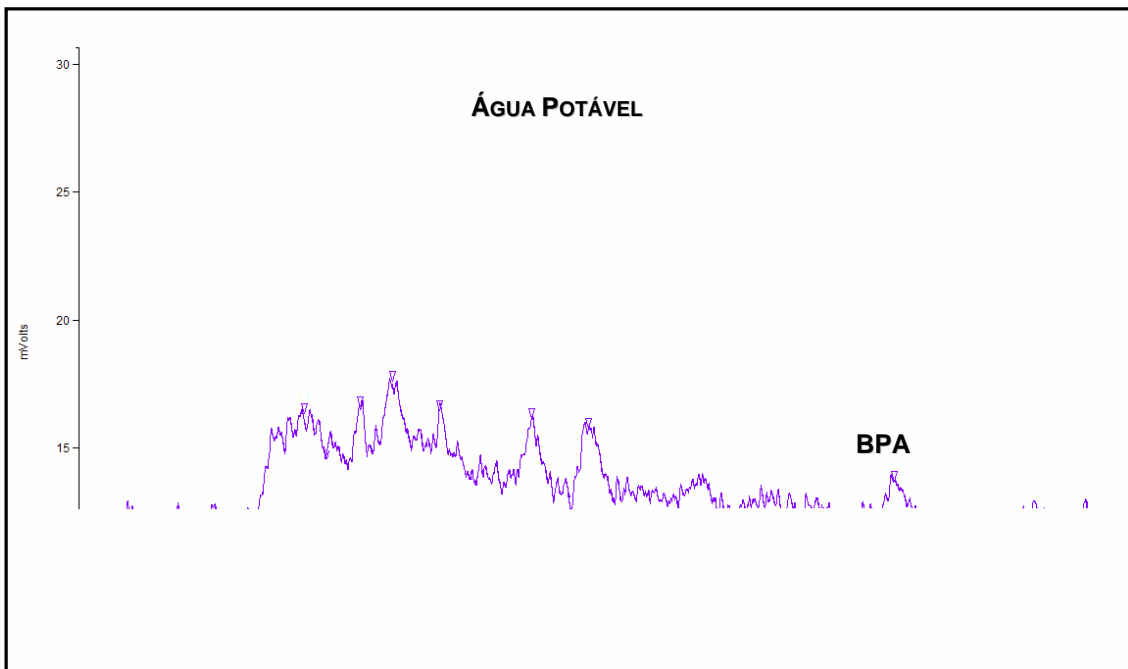


Figura 29. Cromatograma do extrato da água potável



4.7. EFICIÊNCIA DO MÉTODO PARA ÁGUA BRUTA

Amostras de água bruta foram fortificadas em três níveis de concentração (0,06; 0,1 e 0,2 ng mL⁻¹) para comprovar a eficácia do método desenvolvido.

As Figuras 30 a 32 apresentam respectivamente as recuperações dos níveis 30, 50 e 100 ng mL⁻¹ adicionados à amostra, juntamente com os padrões correspondentes.

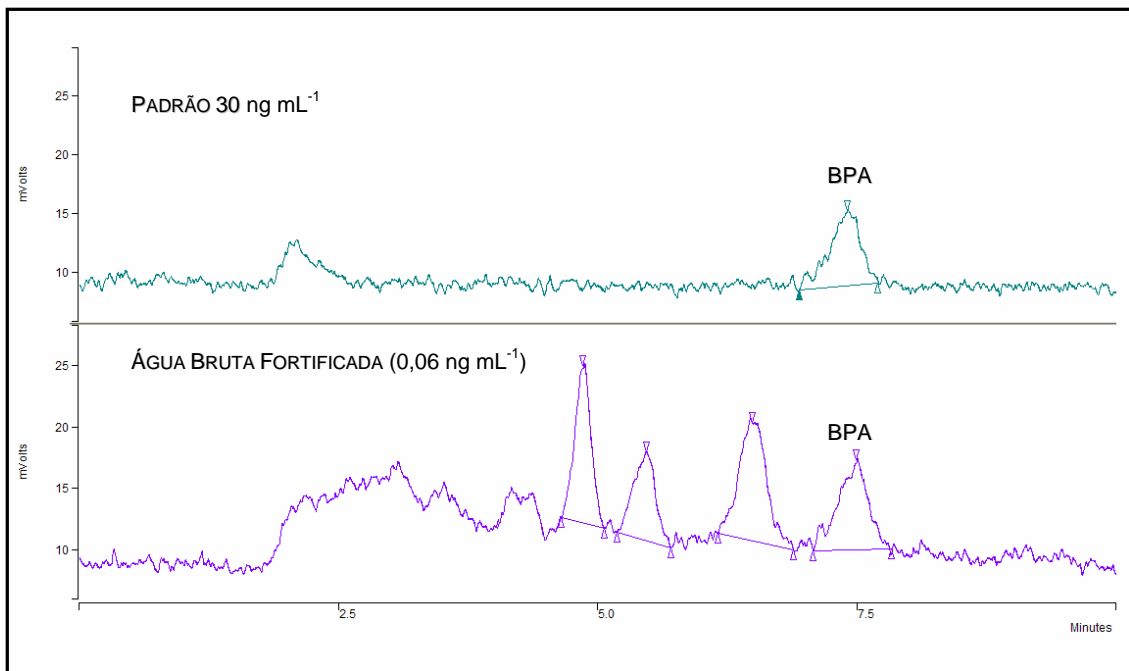


Figura 30. Cromatograma do extrato da água bruta fortificada e solução padrão 30 ng mL⁻¹

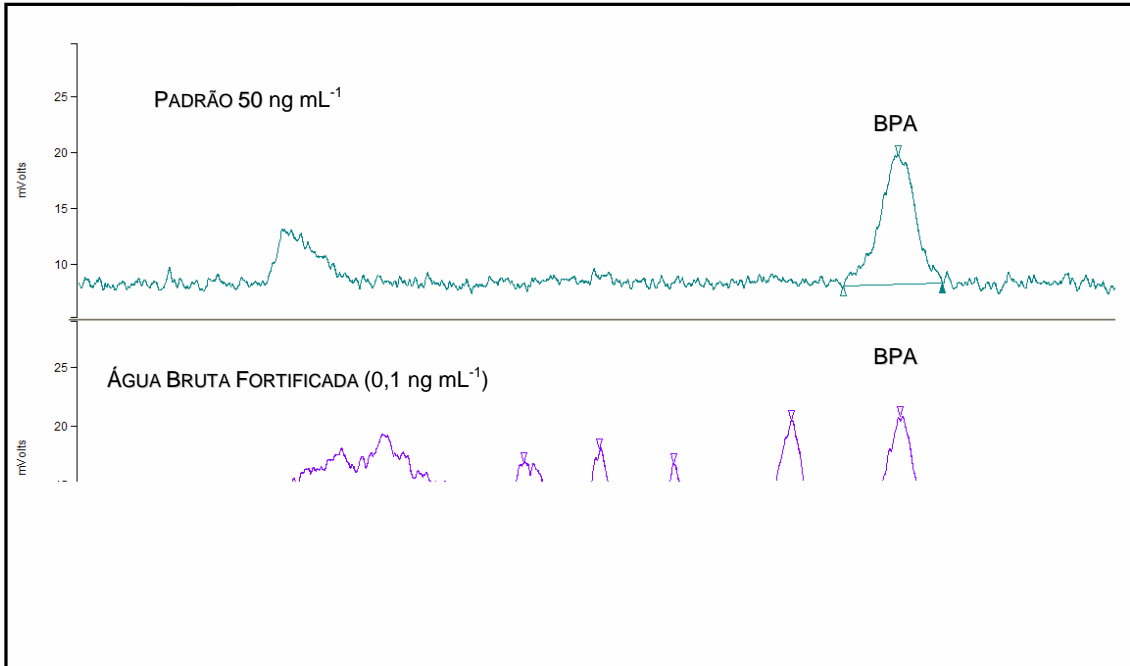


Figura 31. Cromatograma do extrato da água bruta fortificada e solução padrão 50 ng mL⁻¹

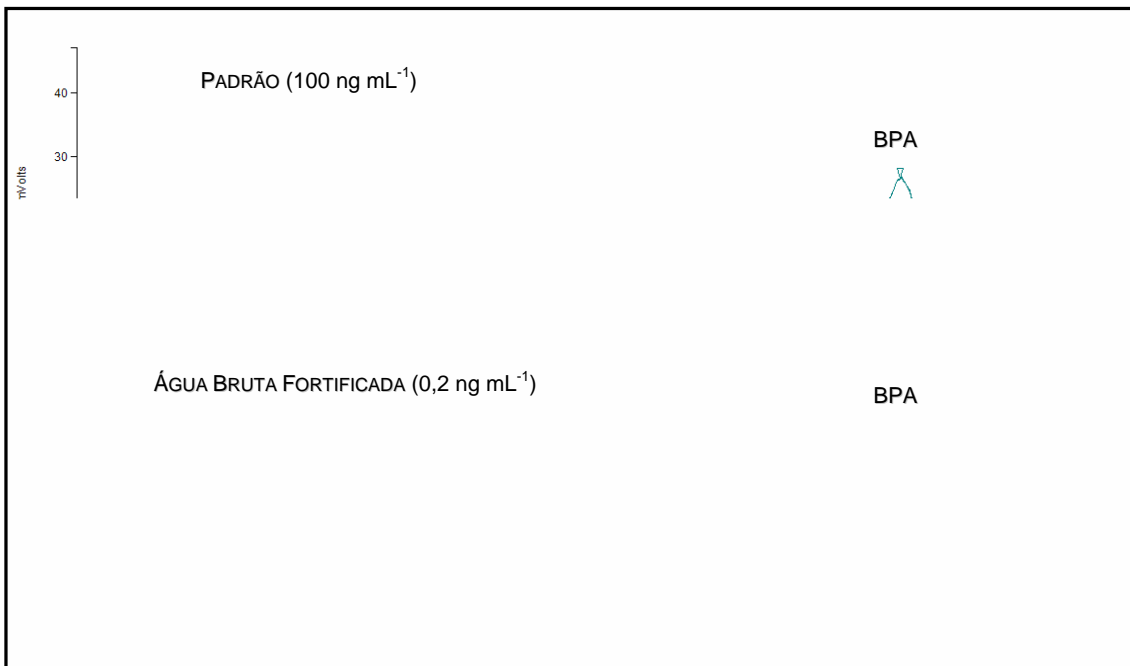


Figura 32. Cromatograma do extrato da água bruta fortificada e solução padrão 100 ng mL⁻¹



Analisando as Figuras 30 a 32, verifica-se que o método desenvolvido aplicado às amostras de águas naturais provenientes dos pontos de captação obteve uma boa performance de acordo com os dados contidos na Tabela 13.

Tabela 13. Níveis de fortificação da água bruta e seus respectivos valores de Recuperação e Coeficiente de Variação

ÁGUA BRUTA FORTIFICADA (n=3)		
Fortificação (ng mL⁻¹)	R(%)	CV(%)
30	85,87	2,3
50	86,20	2,0
100	87,00	1,1

O método desenvolvido foi comparado com métodos descritos na literatura que envolvem o mesmo tipo de matriz e contaminante estudado (BPA) de acordo com a Tabela 14, onde verificou-se que o método proposto possui bons valores de recuperação e baixos valores de coeficiente de variação. Além disso, com o método proposto conseguiu-se atingir valores menores de LD e LQ com a literatura que utilizou a mesma técnica analítica.



INSTITUTO DE QUÍMICA/UNESP



exatidão estando de acordo com trabalhos da literatura que apresentam parâmetros para a validação metodológica.

Na literatura os valores encontrados para BPA em água superficial variam entre 9 a 450 ng L⁻¹ [47, 49, 64,86, 87]



5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo resultou em um método simples e eficiente para a determinação de bisfenol A em amostras de águas naturais. O procedimento proposto requer pequena quantidade de amostra e baixo consumo de solvente, em comparação aos métodos descritos na literatura para esta matriz. Determinou-se também alguns critérios de validação tais como a exatidão, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), linearidade, faixa de trabalho, limite de detecção e quantificação e seletividade.

A validação do método desenvolvido mostrou bons resultados de linearidade, coeficiente de correlação ($>0,9998$), de recuperação ($99\% < R < 101\%$) e de precisão ($< 10\%$).

A aplicação do método às amostras coletadas da ETA de Araraquara, possibilitou a análise qualitativa e quantitativa quanto à presença de bisfenol A na água bruta e potável.

Os valores de BPA encontrados na água para consumo humano da cidade avaliada são preocupantes, uma vez que estudos indicam a atividade estrogênica de BPA em concentração da ordem de 1 ppt. Portanto, um monitoramento ambiental é de extrema relevância.



REFERÊNCIAS

1 LEE, H. B.; PEART, T. E. Bisphenol A contamination in Canadian municipal and industrial wastewater and sludge samples. **Water Quality Research Journal of Canada**, v. 35, n. 2, p. 283-298, 2000.

2 LEE, H. B.; PEART, T. E. Organic contaminants in Canadian municipal sewage sludge. Part I: toxic or endocrine disrupting phenolic compounds. **Water Quality Research Journal of Canada**, v. 37, n. 4, p. 681-696, 2002.

3 POJANA, G.; BONFA, A.; BUSETTI, F.; COLLARIN, A.; MARCOMINI, A. Estrogenic potential of the Venice, Italy, lagoon waters. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, n. 8, p. 1874-1880, 2004.

4 AZEVEDO, D. A.; LACORTE, S.; VIANA, P.; BARCELÓ, D. Occurrence of nonylphenol and bisphenol A in surface water from Portugal. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 4, p. 532-537, 2001.

5 BELFROID, A.; VELZEN, M.; HORST, B.; VETHAAK, D. Occurrence of bisphenol A in surface water and uptake in fish: evaluation of field measurements. **Chemosphere**, v. 49, p. 97-103, 2002.

6 GUILLETTE, L. J.; GROSS T. S.; MASSON G. R.; MATTER J. M.; PERCIVAL H. F.; WOODWARD, A. R. Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. **Environmental Health Perspectives**, v. 102, n. 8, p. 680-688, 1994.

7 TOPPARI, J.; LARSEN, J.; CHRISTIANSEN, P.; GIWERCMAN, A.; GRANDJEAN, P.; GUILLETTE, L.; JEGOU, B.; JENSEN, T.; JOUANNET, P.; KEIDING, N.; LEFFERS, H.; MCLACHLAN, J.; MEYER, O.; MÜLLER, J.; RAJPERT-DE MEYTS, E.; SCHEIKE, T.; SHARPE, R.; SUMPTER, J.; SKAKKEK, N. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. **Environmental Health Perspectives**, v. 104, p. 741-803, 1996.

8 STAPLES, C. A.; DORN, P. B.; KLECKA, G. M.; O'BLOCK, S. T.; BRANSON, D. R.; HARRIS, L. R. Bisphenol A concentrations in receiving waters near US



manufacturing and processing facilities. **Chemosphere**, v. 40, p. 521–525, 2000.

9 LEHNINGER, A. L.; COX, M. M.; NELSON, D. L. **Princípios de bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1995. 839 p.

10 REYS, L. P. Tóxicos ambientais desreguladores do sistema endócrino. **RFML**, v. 8, p. 213-225, 2001.

11 TERNES, T. Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 20, n. 8, p. 419-434, 2001.

12 TERNES, T. A.; STUMPF, M.; MUELLER, J.; HABERER, K.; WILKEN, R. D.; SERVOS, M. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. **The Science of Total Environment**, v. 225, p. 81-90, 1999.

13 YING, G. G.; KOOKANA, R. S.; RU, Y. J. Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates - a review. **Environment International**, v. 28, p. 215-226, 2002.

14 INSTITUTE FOR ENVIRONMENT AND HEALTH. Environmental oestrogens. consequences to human health and wildlife. 1995. 112 p. Disponível em: <<http://www.silsoe.com.cranfield.ac.k./ieh/pdf/a1.pdf>>. Acesso em: 05 jul. 2006.

15 COLBORN, T.; VOM SAAL, F.; SOTO, A. M. Developmental effects of endocrine disrupting chemicals in wildlife and humans. **Environmental Health Perspectives**, v. 101, p. 378-385, 1993.

16 SUMPTER, J. P. Xenoendocrine disrupters — environmental impacts. **Toxicology Letters**, v. 337, p. 102–103, 1998.

17 DESBROW, C.; ROUTLEDGE, E. J.; BRIGHTY, G. C.; SUMPTER, J. P.; WALDOCK, M. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. **Environmental Science Technology**, v. 32, n. 11, p. 1549-1558, 1998.



- 18 ROUTLEDGE, E. J.; SHEAHAN, D.; DESBROW, C.; BRIGHTY, G. C.; WALDOCK, M.; SUMPTER, J. P. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach. **Environmental Science Technology**, v. 32, n. 11, p. 1559-1565, 1998.
- 19 OLEA, N. R.; PULGAR, P.; PEREZ, F.; OLEASERRANO, A.; RIVAS, A.; NOVILLO-FERTRELL, V.; PEDRAZA, A. S.; SONNENSCHNEIN, C. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. **Environmental Health Perspectives**, v. 104, n. 3, p. 298-305, 1996.
- 20 THE WORKING GROUP ON ENDOCRINE DISRUPTERS OF THE SCIENTIFIC COMMITTEE ON TOXICITY, ECOTOXICITY AND THE ENVIRONMENT. **Opinion on human and wildlife health effects of endocrine disrupting chemicals, with emphasis on wildlife and on ecotoxicology test methods**. Bruxelles, 1999. 96 p.
- 21 COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. Communication from the Commission to the Council and the European Parliament. Community strategy for endocrine disruptors, a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife. **COM (1999) 706**. Brussels, 1999. 31 p.
- 22 STAPLES, C. A.; WOODBURN, K.; CASPERS, N.; HALL, A. T.; KLECKA, G. M. A weight of evidence approach to the aquatic hazard assessment of bisphenol A. **Human and Ecological Risk Assessment**, v. 8, p. 1083-1105, 2002.
- 23 STAPLES, C. A.; DORN, P. B.; KLECKA, G. M.; O'BLOCK, S. T.; HARRIS, L. R. A review of the environmental fate, effects and exposure of bisphenol A. **Chemosphere**, v. 36, n. 10, p. 2149-2173, 1998.
- 24 KRISHNAN, A.; STATHIS, P.; PERMUTH, S.; TOKES, L.; FELDMAN, D. **Endocrinology**, v. 132, p. 2279-2286, 1993.
- 25 BROTONS, J.; OLEA-SERRANO, M.; VILLALOBOS, M.; PEDRAZA, V.; OLEA, N. **Environmental Health Perspectives**, v. 103, p. 608-612, 1995.



26 VON SAAL, F. S.; COOKE, P. S.; BUCHANAN, D. L.; PAIANZA, P.; THAYER, K. A.; NAGEL, S. C.; PARMIGIANI, S.; WELSHONS, W. V. **Toxicology and Health**, v. 14, p. 239-245, 1998.

27 FISHER, J. S.; TURNER, K. J.; BROWN, D.; SHARPE, R. M. **Environmental Health Perspectives**, v. 107, p. 397-403, 1999.

28 STEINMETZ, R.; MITCHNER, N. A.; GRANT, A.; ALLEN, D. L.; BIGSBY, R. M.; BEN-JONATHAN, N. **Endocrinology**, v. 138, p. 1780-1785, 1997.

29 NERÍN, C.; FERNÁNDEZ C.; DOMEÑO, C.; SALAFRANCA, J. Determination of potential migrants in polycarbonate containers used for microwave ovens by high-performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 5647-5653, 2003.

30 SUN, Y.; WADA, M.; KURODA, N.; HIRAYAMA, K.; NAKAZAWA, H.; NAKASHIMA, K. Simultaneous determination of phenolic xenoestrogens by solid-phase extraction and high - performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Analytical Sciences**, v. 17, p. 697-702, 2001.

31 COUSINS, I. T.; STAPLES, C. A.; KLECKA, G. M.; MACKAY, D. A multimedia assessment of the environmental fate of bisphenol A. **Human and Ecological Risk Assessment**, v. 8, n. 5, p. 1107-1135, 2002.

32 ENDOCRINE DISRUPTOR SCREENING AND TESTING ADVISORY COMMITTEE. Final Report. **EPA/743/R-98/003**. Washington: U.S Environmental Protection Agency, 1998.

33 U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **EPA/630/R-96/012**: special report on environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis. Washington, 1997.

34 LYONS, G. Bisphenol A: a know endocrine disrupter. **A WWF European Toxics Programme Report**. 2000. 37 p. Disponível em: <<http://www.wwf.org.k/flielibrary/pdf/bpa.pdf>>. Acesso em: 05 jul. 06.



35 BASHEER, C.; LEE, H. K.; TAN, K. S. Endocrine disrupting alkylphenols and bisphenol-A in coastal waters and supermarket seafood from Singapore. **Baseline / Marine Pollution Bulletin**, v. 48, p. 1145–1167, 2004.

36 BRASIL. Ministério da Saúde. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Portaria 518, de 25 de março de 2004. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/portaria_518_2004.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2006.

37 BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Resolução 357, de 18 de março de 2005. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2006.

38 BACIA HIDROGRÁFICA DE ARARAQUARA. Aquífero Guarani. Disponível em: <www.daaearaquara.com.br>. Acesso em: 18 jan. 2006.

39 VOGEL, A. I. **Análise química quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002. 488 p.

40 LEITE, F. **Amostragem fora e dentro do laboratório**. Campinas: Alínea, 2005. 98 p.

41 EGLI, H.; DASSENAKIS, M.; GARELICK, H.; GRIEKEN, R. V.; PEIJNENBURG, W. J. G.M.; KLASINC, L.; KORDEL, W.; PRIEST, N.; TAVARES, T. Minimum requirements for reporting analytical data for environmental samples. **Pure and Applied Chemistry**, v. 75, n. 8, p. 1097-1106, 2003.

42 HANSEN, P. D.; DIZER, H.; HOCK, B.; MARX, A.; SHERRY, J.; MCMASTER, M.; BLAISE, C. Vitellogenin – a biomarker for endocrine disruptors. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 17, n.7, p. 448-451, 1998.



43 FOLMAR, L. C.; DENSLOW, N. D.; RAO, V.; CHOW, M.; CRAIN, D. A.; ENBLUM, J.; MARCINO, J.; GUILLETTE, L. J. Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. **Environment Health Perspectives**, v. 104, p. 1096-1101, 1996.

44 OOSTERKAMO, A. J.; HOCK, B.; SEIFERT, M.; IRTH, H. Novel monitoring strategies for xenoestrogens. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 16, n. 10, p. 544-553, 1997.

45 YOON, Y.; WESTERHOF, F. P.; SNYDER, S. A.; ESPARZAA, M. HPLC-fluorescence detection and adsorption of bisphenol A, 17 β -estradiol, and 17 α ethynyl estradiol on powdered activated carbon. **Water Research**, v. 37, p. 3530-3537, 2003.

46 WATABE, Y.; KONDO, T.; IMAI, H.; MORITA, M.; TANAKA, N.; HAGINAKA, J.; HOSOYA, K. Improved detectability with a polymer - based trapping device in rapid HPLC analysis for ultra-low levels of bisphenol (A) in environmental samples. **Analytical Science**, v. 20, p. 133-137, 2004.

47 LIU, R.; ZHOU, J. L.; WILDING, A. Simultaneous determination of endocrine disrupting phenolic compounds and steroids in water by solid-phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography, A**, v. 1022, p. 179-189, 2004.

48 HOHENBLUM, P.; GANS, O.; MOCHE, W.; SCHARF, S.; LORBEER, G. Monitoring of selected estrogenic hormones and industrial chemicals in groundwaters and surface waters in Austria. **Science of the Total Environment**, v. 333, p. 185-193, 2004.

49 BROSSA, L.; POCURULL, E.; BORRUL, F.; MARCÉ, R. M. Solid-phase extraction/high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry to determine endocrine disruptors in water samples. **Chromatographia**, v. 59, p. 419-423, 2004.

50 HERNANDO, M. D.; MEZCUA, M.; GÓMEZ, M. J.; MALATO, O.; AGÜERA, A.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Comparative study of analytical methods involving gas chromatography-mass spectrometry after derivatization and chromatography-



tandem mass spectrometry for the determination of selected endocrine disrupting compounds in wastewaters. **Journal of Chromatography, A**, v. 1047, p. 129-135, 2004.

51 BOLZ, U.; KÖRNER, W.; HAGENMAIER, H. Development and validation of a GC/MS method for determination of phenolic xenoestrogens in aquatic samples. **Chemosphere**, v. 40, p. 929-935, 2000.

52 MOL, H. G. J.; SUNARTO, S.; STEIJGER, O. M. Determination of endocrine disruptors in water after derivatization with *N*-methyl-*N*-(*tert*-butyldimethyltrifluoroacetamide) using gas chromatography with mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography, A**, v. 879, p. 97-112, 2000.

53 LAGANÀ, A.; BACALONI, A.; DE LEVA, I.; FABERI, A.; FAGO, G.; MARINO, A. Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 501, p. 79-88, 2004.

54 MARTÍNEZ, R. C.; GONZALO, E. R.; RUIZ, P. R. Determination of weakly acidic endocrine-disrupting compounds by liquid chromatography–mass spectrometry with post-column base addition. **Journal of Chromatography, A**, v. 1056, p. 131–138, 2004.

55 MAO, L.; SUN, C.; ZHANG, H.; LI, Y.; WU, D. Determination of environmental estrogens in human urine by high performance liquid chromatography after fluorescent derivatization with *p*-nitrobenzoyl chloride. **Analytica Chimica Acta**, v. 522, p. 241-246, 2004.

56 SUN, Y.; WADA, M.; KURODA, N.; HIRAYAMA, K.; NAKAZAWA, H.; NAKASHIMA, K. Simultaneous determination of phenolic xenoestrogens by solid-phase extraction and high - performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Analytical Sciences**, v. 17, p. 697-702, 2001.

57 BASHEER, C.; LEE, H. K. Analysis of endocrine disrupting alkylphenols, chlorophenols and bisphenol-A using hollow fiber-protected liquid-phase microextraction coupled with injection port-derivatization gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography, A**, v. 1057, p. 163–169, 2004.



58 BRAUN, P.; MOEDER, M.; SCHRADER, St.; POPP, P.; KUSCHK, P.; ENGEWALD, W. Trace analysis of technical nonylphenol, bisphenol A and 17 α -ethinylestradiol in wastewater using solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography, A**, v. 988, p. 41–51, 2003.

59 HELALEH, M. I. H.; FUJII, S.; KORENAGA, T. Column silylation method for determining endocrine disruptors from environmental water samples by solid phase micro-extraction. **Talanta**, v. 54, p. 1039–1047, 2001.

60 PEÑALVER, A.; GARCÍA, V.; POCURULL, E.; BORRUL, F.; MARCÉ, R. M. Stir bar sorptive extraction and large volume injection gas chromatography to determine a group of endocrine disruptors in water samples. **Journal of Chromatography, A**, v. 1007, p. 1–9, 2003.

61 NAKAMURA, S.; DAISHIMA, S. Simultaneous determination of alkylphenols and bisphenol A in river water by stir bar sorptive extraction with in situ acetylation and thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography, A**, v. 1038, p. 291–294, 2004.

62 KAWAGUCHI, M.; INOE, K.; YOSHIMURA, M.; SAKUI, N.; OKANOUCI, N.; ITO, R.; YOSHIMURA, Y.; NAKAZAWA, H. Trace analysis of phenolic xenoestrogens in water samples by stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography, A**, v. 1041, p. 19–26, 2004.

63 KAWAGUCHI, M.; INOUE, K.; YOSHIMURA, M.; ITO, R.; NORIHIRO, S.; OKANOUCI, N.; NAKAZAWA, H. Determination of bisphenol A in river water and body fluid samples by stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption-gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography, B**, v. 805, p. 41–48, 2004.

64 KANG, J. W.; KONDO, F. Determination of bisphenol A in canned pet foods. **Research in Veterinary Science**, v. 73, p. 177–182, 2002.

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



66 INOUE, K.; MURAYAMA, S.; TAKEBA, K.; YOSHIMURA, Y.; NAKAZAWA, H. Contamination of xenoestrogens bisphenol A and F in honey: safety assessment and analytical method of these compounds in honey. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 16, p. 497-506, 2003.

67 REGAN, F.; MORAN, A.; FOGARTY, B.; DEMPSEY, E. Development of comparative methods using gas chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis for determination of endocrine disrupting chemicals in bio-solids. **Journal of Chromatography, B**, v. 770, p. 243-253, 2002.

68 BERKNER, S.; STRECK, G.; HERMANN, R. Development and validation of a method determination of trace levels of alkylphenols and bisphenol A in atmospheric samples. **Chemosphere**, v. 54, p. 575-584, 2004.

69 YOSHIMURA, Y.; BROCK, J. W.; MAKINO, T.; NAKAZAWA, H. Measurement of bisphenol A in human serum by gas chromatography/mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 458, p. 331-336, 2002.

70 HAYASHI, Y.; MATSUDA, R.; HAISHIMA, Y.; YAGAMI, T.; NAKAMURA, A. Validation of HPLC and GC-MS systems for bisphenol A leached from hemodialyzers on the basis of FUMI theory. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, p. 421-429, 2002.

71 SHAO, B.; HAN, H.; HU, J.; ZHAO, J.; WU, G.; XUE, Y.; MA, Y.; ZHANG, S. Determination of alkylphenol and bisphenol A in beverages using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 530, p. 245-252, 2005.

72 PATROLECCO, L.; CAPRI, S.; DE ANGELIS, S.; POLESELLO, S.; VALSECCHI, S. Determination of endocrine disrupting chemicals in environmental solid matrices by extraction with a non-ionic surfactant. **Journal of Chromatography, A**, v. 1022, p. 1-7, 2004.

73 TOYO'OKA, T.; OSHIGE, Y. Determination of alkylphenols in mineral water contained in pet bottles by liquid chromatography with coulometric detection. **Analytical Sciences**, v. 16, p. 1071-1076, 2000.



74 CITAC; EURACHEM. **Guide to quality in analytical chemistry**: an aid to accreditation. Disponível em:

<<http://www.erachem.ul.pt/guides/CITAC%20EURACHEM%20GUIDE.pdf>>.

Acesso em: 08 dez. 2005.

75 RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C.; JARDIM, I. C. F. S.; MELO, L. F. C. Validação de métodos cromatográficos. **Química Nova**, n. 5, p. 771-80, 2004.

76 ANALYTICAL PROCEDURES AND METHOD VALIDATION. Highlights of the FDA's Draft Guidance. **LCGC**, v. 19, n. 1, p. 74-79, 2001.

77 CURRIE, L. A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995).

Analytica Chimica Acta, v. 391, p. 105-126, 1999.

78 INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2005.

79 INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos**, DOQ-CGCRE-008, 2003.

80 INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. **Validation of Analytical Procedures**. Geneva, 1996. 9 p.

81 UNITED STATES PHARMACOPEIA CONVENTION. **US Pharmacopeia 24**: validation of compendial methods <1225>. Rockville, 1999.

82 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos"; fica revogada a Resolução RE nº 475, de 19 de março de 2002. Resolução n. 899, de 29 de maio de 2003. Disponível em: <http://anvisa.gov.br/legis/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 15 jul. 2004.



83 BRITO, N. M.; AMARANTE JÚNIOR, O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L.
Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.

84 BRITO, N. M.; AMARANTE JÚNIOR, O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L.;
SANTOS, T. C. R.