UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento de um método simples e rápido para determinação de bisfenol A em amostras de papéis por espectroscopia de fluorescência sincronizada

Matheus Gallimberti

Ribeirão Preto
2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento de um método simples e rápido para determinação de
bisfenol A em amostras de papéis por espectroscopia de fluorescência
sincronizada

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências
Área de Concentração: Toxicologia.

Orientado: Matheus Gallimberti
Orientador: Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior
Coorientador: Dr. Bruno Alves Rocha

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia em 28/11/2017. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Gallimberti, Matheus

Desenvolvimento de um método simples e rápido para determinação de Bisfenol A em amostras de papéis por espectroscopia de fluorescência sincronizada. Ribeirão Preto, 2018.

70p.:il.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior.

1. Bisfenol A. 2. Fluorescência sincronizada 3. Papel termossensível
4. Determinação 5. Exposição 6. Metodologia

FOLHA DE APROVAÇÃO

Matheus Gallimberti

Desenvolvimento de um método simples e rápido para determinação de bisfenol A em amostras de papéis por espectroscopia de fluorescência sincronizada

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Foi o tempo que dedicastes à tua rosa que a fez tão importante.
(Antonie de Saint-Exupéry)

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior, meus sinceros agradecimentos pelos seus ensinamentos, pela oportunidade em ser seu aluno e seu constante incentivo e entusiasmos durante todas as etapas.

Ao meu coorientador Dr. Bruno Alves Rocha, pela instrução, orientação, paciência, amizade, confiança, incentivo e colaboração na realização e compreensão dos experimentos.

Aos colegas do Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais, em especial a técnica do laboratório, Dra. Vanessa Cristina de Oliveira Souza, pela colaboração e auxílio na realização dos experimentos, contribuindo para o desenvolvimento do trabalho com comentários, crítica, sugestões e todo apoio.

A todos os funcionários do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Em especial todos da secretaria e seção de pós-graduação pela atenção e dedicação nas minhas constantes dúvidas.

Aos meus pais, pelo incentivo e apoio constante no processo de elaboração do trabalho.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, muito obrigado!

A CAPES pela bolsa concedida e a FAPESP pelo apoio financeiro.

RESUMO

GALLIMBERTI, MATHEUS. **Desenvolvimento de um método simples e rápido para determinação de bisfenol A em amostras de papéis por espectroscopia de fluorescência sincronizada**. 2018. 70f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Bisfenol A (BFA) é usado em uma variedade de produtos de consumo, incluindo alguns tipos de papéis, principalmente os papéis termossensíveis, no qual é utilizado como revelador. Mesmo assim, pouco é conhecido sobre a magnitude da contaminação ou exposição humana ao BFA, como resultado do contato com papéis. Neste estudo, foi desenvolvido e validado uma metodologia para determinação de BFA por espectroscopia de fluorescência sincronizada. O método desenvolvido e validado é rápido, simples e de baixo custo e apresenta boa sensibilidade, sendo apropriado para aplicação em amostras de papéis. O método apresentou linearidade no intervalo de concentração entre 25 e 450 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ($r = 0,9993$). Os limites de detecção e quantificação foram de 1,20 e 3,99 $\mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. Valores de precisão inter e intra ensaio foram de 3,21 a 8,54% e de 0,29 a 3,92%, respectivamente. A exatidão variou de 87,4 a 111% (para as concentrações de 25, 250 e 450 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Os valores de recuperação estiveram entre 100 e 102% (amostra extraída). A metodologia validada foi aplicada na determinação de BFA em 13 tipos de produtos de papel ($n=444$), incluindo papel termossensível ($n=341$), bilhete de loteria ($n=7$), bilhete de ônibus ($n=5$), cartão de visita ($n=12$), envelope ($n=11$), flyer ($n=10$), guardanapo ($n=8$), papel de impressão sulfite A4 ($n=3$), embalagem de alimento ($n=20$), papel higiênico ($n=8$), papel toalha ($n=4$) e revista ($n=9$), jornal ($n=6$). BFA foi encontrado em 98% das amostras de papel termossensível ($n = 341$) com concentrações variando desde menores que o LQ até 27,7 mg.g^{-1} e média geométrica e mediana de 14,6 mg.g^{-1} e 17,7 mg.g^{-1} , respectivamente. Já a maioria (96%) dos outros tipos de papéis analisados ($n = 103$) apresentou concentrações de BFA variando desde menores que o LQ até 379 $\mu\text{g.g}^{-1}$ e média geométrica e mediana de 14,7 $\mu\text{g.g}^{-1}$ e 17,3 $\mu\text{g.g}^{-1}$, respectivamente. Os papéis termossensíveis apresentaram mais altas concentrações de BFA (ordem de mg.g^{-1}) comparado aos outros tipos de papéis analisados, principalmente os produzidos a partir de papel reciclado com concentrações na ordem de $\mu\text{g.g}^{-1}$. A estimativa da exposição humana ao BFA através da manipulação de

diferentes tipos de papéis foi estimada baseado na concentração de BFA e frequência de manipulação. A ingestão diária aceitável de BFA, ajustada pelo peso corporal (calculado para a mediana das concentrações), através da absorção dérmica, via manipulação de papéis pela população em geral e por indivíduos expostos ocupacionalmente foi de 14,5 e 1070 (ng/Kg peso corporal/dia), respectivamente.

Palavras-chaves: Bisfenol A (BFA). Papel Termossensível. Fluorescência Sincronizada. Determinação. Exposição. Metodologia.

ABSTRACT

GALLIMBERTI, MATHEUS. **Development of a simple and rapid method for determination of bisphenol A in paper samples by synchronous fluorescence spectroscopy**. 2018. 70f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017

Bisphenol A (BPA) is used in a variety of consumer products, including some paper products, particularly thermal receipt papers, for which it is used as a color developer. Nevertheless, little is known about the magnitude of BPA contamination or human exposure to BPA as a result of contact with papers. In this study, was develop and validate an methodology for determination of BPA by synchronous fluorescence spectroscopy. The developed and validated method was fast, easy, low cost, with a good sensibility and appropriate for application in paper samples. The method was linear on the range of to 25 a 450 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ($r = 0,9993$). The detection and quantification limits were 1,20 and 3,99 $\mu\text{g.L}^{-1}$ respectively. Inter and intraday precision were between 3,21 to 8,54% and 0,29 to 3,92%, respectively. Accuracy was between 87,4 to 111%. The recovery was between 100 to 102 % (extracted samples). The validated methodology was applied in the BPA determination in 13 types pf paper products ($n=444$), including thermal receipt papers ($n=341$), lottery tickets ($n=7$), bus tickets ($n=5$), business cards ($n=12$), mailing envelopes ($n=11$), flyers ($n=10$), napkins ($n=8$), printing paper ($n=3$), food contact paper ($n=20$), kitchen rolls ($n=4$), toilet paper ($n=8$), newspaper ($n=6$), and magazines ($n=9$). BPA was found in 98% of thermal receipt papers ($n = 341$) at concentrations ranging from below the limit of quantitation (LOQ) to 27,7 mg.g^{-1} with a geometric mean of 14,6 mg.g^{-1} and a median of 17,7 mg.g^{-1} . The majority (96%) of other paper products ($n = 103$) contained BPA at concentrations ranging from below the LOQ to 379 $\mu\text{g.g}^{-1}$ with a geometric mean of 14,7 $\mu\text{g.g}^{-1}$ and a median of 17,3 $\mu\text{g.g}^{-1}$. Whereas thermal receipt papers contained the highest concentrations of BPA (milligram-per-gram), the others types of papers, especially those produced from recycled paper contain lower concentrations of BPA (microgram-per-gram). Estimation of human exposure to BFA through manipulation of different paper types was calculated based on the measure of concentration and frequency of manipulation. The estimated daily intake for BFA adjusted body weight (calculated at median concentrations) through dermal absorption from handling of papers was 14.5 and 1070 ng/day for the general population and occupationally exposed individuals,

respectively.

Keywords: Bisphenol A (BFA). Thermal paper. Synchronous Fluorescence. Determination. Exposure. Methodology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Bisfenol A (BFA).....	2
Figura 2. Reação de formação do policarbonato.....	3
Figura 3. Reação de formação da resina epóxi.....	3
Figura 4. Esquema do papel termossensível e do processo de impressão.....	4
Figura 5. Reação reversível entre BFA e corante leuco.....	5
Figura 6. Bisfenol S (BFS).....	7
Figura 7. Diagrama de Jablonski.....	10
Figura 8. Diferentes espectros de fluorescência.....	13
Figura 9. Espectro de emissão, excitação e fluorescência sincronizada.....	14
Figura 10. Diagrama de blocos representando o procedimento de extração de BFA e BFS.....	25
Figura 11. Espectro de excitação BFA e BFS.....	28
Figura 12. Espectro de emissão de BFA e BFS.....	29
Figura-13. Espectro de fluorescência sincronizada BFA e BFS em $\Delta\lambda = 5\text{nm}$	30
Figura 14. Espectro de fluorescência sincronizada BFA e BFS em $\Delta\lambda = 10\text{nm}$	30
Figura 15. Espectro de fluorescência sincronizada BFA e BFS em $\Delta\lambda = 15\text{nm}$	30
Figura 16. Espectro de fluorescência sincronizada BFA e BFS em $\Delta\lambda = 20\text{nm}$	30
Figura 17. Espectro de fluorescência sincronizada BFA e BFS em $\Delta\lambda = 25\text{nm}$	31
Figura 18. Espectro de fluorescência sincronizada BFA e BFS em $\Delta\lambda = 30\text{nm}$	31
Figura 19. Espectro de fluorescência sincronizada BFA e BFS em $\Delta\lambda = 35\text{nm}$	31
Figura 20. Espectro de fluorescência sincronizada BFA e BFS em $\Delta\lambda = 40\text{nm}$	31
Figura 21. Espectro de fluorescência sincronizada BFA e BFS em $\Delta\lambda = 45\text{nm}$	31
Figura 22. Espectro de fluorescência sincronizada BFA e BFS em $\Delta\lambda = 50\text{nm}$	31

Figura 23. Espectro de fluorescência sincronizada BFA e BFS em $\Delta\lambda = 55\text{nm}$	32
Figura 24. Espectro de fluorescência sincronizada BFA e BFS em $\Delta\lambda = 60\text{nm}$	32
Figura 25. Espectro de fluorescência sincronizada BFA e BFS em $\Delta\lambda = 65\text{nm}$	32
Figura 26. Espectro de fluorescência sincronizada BFA e BFS em $\Delta\lambda = 70\text{nm}$	32
Figura 27. Espectro de fluorescência sincronizada BFA e BFS em $\Delta\lambda = 75\text{nm}$	32
Figura 28. Espectro de fluorescência sincronizada BFA e BFS em $\Delta\lambda = 80\text{nm}$	32
Figura 29. Espectro de fluorescência sincronizada BFA e BFS em $\Delta\lambda = 85\text{nm}$	33
Figura 30. Espectro de fluorescência sincronizada BFA e BFS em $\Delta\lambda = 90\text{nm}$	33
Figura 31. Espectro de fluorescência sincronizada BFA e BFS em $\Delta\lambda = 95\text{nm}$	33
Figura 32. Curvas de linearidade do BFA em diferentes dias.....	34
Figura 33. Gráfico de resíduos padronizados obtidos da curva analítica do 1º Dia.....	37
Figura 34. Gráfico de resíduos padronizados obtidos da curva analítica do 2º Dia.....	37
Figura 35. Gráfico de resíduos padronizados obtidos da curva analítica do 3º Dia.....	38
Figura 36. Gráfico de probabilidade normal de resíduos 1º Dia.....	39
Figura 37. Gráfico de probabilidade normal de resíduos 2º Dia.....	39
Figura 38. Gráfico de probabilidade normal de resíduos 3º Dia.....	40
Figura 39. Concentração de BFA da amostra 1 após cada ciclo de extração.....	45
Figura 40. Concentração de BFA da amostra 2 após cada ciclo de extração.....	45
Figura 41. Concentração de BFA da amostra 3 após cada ciclo de extração.....	46
Figura 42. Curvas analíticas na presença da matriz e sem a presença da matriz.....	47
Figura 43. Intensidade do sinal analítico BFA, BFS e BFA + BFS ($0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ a $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$).....	48
Figura 44. Intensidade do sinal analítico BFA, BFS e BFA + BFS ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ a 100 mg.L^{-1}).....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados referentes à linearidade do método.....	35
Tabela 2. Valores dos resíduos das curvas de calibração obtidas para validação da metodologia.....	36
Tabela 3. Valores dos resíduos padronizados das curvas de calibração obtidas para validação da metodologia.....	36
Tabela 4. Valores de limites de detecção e quantificação do BFA.....	41
Tabela 5. Valores de precisão intra corrida para o BFA.....	42
Tabela 6. Valores de precisão inter corridas para o BFA.....	42
Tabela 7. Valores de exatidão para o BFA.....	43
Tabela 8. Valores de recuperação, desvio padrão e desvio padrão relativo para o BFA não extraído.....	44
Tabela 9. Valores de recuperação, desvio padrão e desvio padrão relativo para o BFA extraído.....	44
Tabela 10. Concentração de BFA (mg.g^{-1}) em 341 papéis termossensíveis brasileiros, classificados de acordo com a localização onde os papéis foram obtidos.....	50
Tabela 11. Concentrações de BFA em papéis termossensíveis em diferentes países.....	53
Tabela 12. Concentração de BFA ($\mu\text{g.g}^{-1}$) em 103 amostras de diferentes tipos de papéis e derivados.....	55
Tabela 13. Concentração de BFA ($\mu\text{g.g}^{-1}$) em 99 amostras de papel nos Estados Unidos.....	57
Tabela 14. Ingestão diária aceitável (IDA; ng/dia) de BFA, via manipulação de papéis, pela população geral e indivíduos expostos ocupacionalmente.....	60

Tabela 15. Ingestão diária aceitável ajustada pelo peso corporal (72Kg) (ng/Kg peso corporal/dia) de BFA, via manipulação de papéis, pela população geral e indivíduos expostos ocupacionalmente.....	61
--	----

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

α	nível de significância
λ	lambda (comprimento de onda)
$\Delta\lambda$	delta lambda (intervalo de comprimento de onda)
λ_{em}	comprimento de onda de emissão
λ_{ex}	comprimento de onda de excitação
$\Delta\nu$	delta ni (diferença no número de onda)
μg	micrograma
μL	microlitro
μs	microsegundo
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
a	inclinação da reta, coeficiente angular
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of official analytical chemists</i>
b	intersecção com o eixo y
BFA	bisfenol A
BFA- <i>d</i> 16	bisfenol A deuterado
BFS	bisfenol S
C	centro
CIE	canto inferior esquerdo
CID	canto inferior direito
CM	centímetro
CSE	canto superior esquerdo
CSD	canto superior direito
CV	coeficiente de variação
DP	desvio padrão
DPR	desvio padrão relativo
e_i	resíduo
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GC	<i>gas chromatograph</i>

HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
IDA	Ingestão diária aceitável
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
kg	quilogramas
kV	quilovolt
kW	quilowatt
L	litro
LC	<i>liquid chromatograph</i>
LC-MS/MS	<i>liquid chromatograph coupled mass spectrometry</i>
LD	limite de detecção
LQ	limite de quantificação
LLE	<i>liquid-liquid extraction</i>
mm	milímetro
mtorr	mili torricelli
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
r	coeficiente de correlação
R	fator de recuperação
RSD	<i>relative standard deviation</i>
S	coeficiente angular, <i>slope</i>
SPE	<i>solid phase extraction</i>
SPME	<i>solid phase micro extraction</i>
S/R	sinal-ruído
TDI	<i>tolerable daily intake</i>
USEPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
USSGS	<i>United States Geological Survey</i>
UV	ultravioleta
V	volt
Vis	visível
OMS	Organização Mundial da Saúde
$\bar{x}$	média aritmética
y_i	valor observado
$\hat{y}_i$	valor estimado

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	iii
Lista de Figuras	v
Lista de Tabelas	vii
Lista de Siglas e Símbolos	ix
 1.INTRODUÇÃO.....	 1
1.1. Contaminantes emergentes.....	1
1.2. Bisfenol A.....	2
1.3. Compostos alternativos ao BFA.....	6
1.4. Bisfenol S.....	7
1.5. Métodos analíticos para determinação de BFA	8
 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	 9
2.1. Luminescência.....	9
2.1.2. Fluorescência.....	9
2.1.2.1. Instrumentação.....	11
2.1.2.2. Fluorescência sincronizada.....	12
 3. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	 15
 4. OBJETIVOS.....	 16
 5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	 17
5.1. Linearidade.....	17
5.2. Precisão.....	18
5.2.1. Repetibilidade.....	18
5.2.2. Precisão intermediária.....	18
5.2.3. Reprodutibilidade.....	19
5.3. Exatidão.....	19
5.4. Recuperação.....	20
5.5. Limite de detecção.....	20

5.6. Limite de quantificação.....	21
5.7. Seletividade.....	21
5.8. Padrões e reagentes.....	21
5.9. Preparo das soluções.....	22
5.9.1. Linearidade.....	22
5.9.2. Precisão e exatidão.....	22
5.9.3. Recuperação.....	22
5.9.4. Seletividade.....	22
5.9.5. Eficiência da extração.....	23
5.10. Otimização do $\Delta\lambda$ fluorescência sincronizada.....	23
5.11. Preparo das amostras.....	24
5.12. Instrumentação.....	26
5.12.1. Espectrofluorímetro.....	26
5.12.2. Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas.....	27
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
6.1. Espectro de emissão e excitação BFA e BFS.....	28
6.2. Otimização $\Delta\lambda$ fluorescência sincronizada.....	29
6.3. Parâmetros de validação.....	34
6.3.1. Linearidade.....	34
6.3.2. Resíduos.....	35
6.3.3. Limite de detecção e quantificação.....	40
6.3.4. Precisão.....	41
6.3.5. Exatidão.....	42
6.3.6. Recuperação.....	43
6.3.7. Avaliação da eficiência do método extração.....	45
6.3.8. Seletividade.....	47
6.4. Avaliação das concentrações de BFA em papéis termossensíveis.....	49
6.5. Avaliação das concentrações de BFA em outros tipos de papéis.....	54
6.6. Exposição humana ao BFA via manipulação de papéis.....	58
7. CONCLUSÃO.....	62
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

1. Introdução

1.1. Contaminantes emergentes

Atualmente, uma atenção especial tem sido dada à presença de uma nova classe de contaminantes, os contaminantes emergentes, no ambiente e o potencial risco à saúde humana associado à exposição a estes compostos (SILVA et al, 2011). Segundo a definição da USGS (USGS, do inglês *United States Geological Survey*) um contaminante emergente é “uma substância química de ocorrência natural ou sintética, ou qualquer microorganismo, que não é rotineiramente monitorado no ambiente, mas que têm potencial para entrar no ambiente e causar efeitos adversos tanto a saúde humana quanto ao ecossistema” (USGS, 2015).

Uma outra definição, baseada em critérios regulatórios, é dada pela USEPA (USEPA, do inglês, *United States Environmental Protection Agency*), na qual contaminantes emergentes são definidos como “poluentes (bióticos ou abióticos) que, atualmente não possuem regulamentação, não são normalmente monitorados no ambiente, mas podem ser candidatos a regulamentação futura, dependendo da sua (eco) toxicidade, efeitos sobre a saúde, percepção pública e frequência de ocorrência no ambiente (USEPA, 2010a).

Ainda segundo a USEPA, os contaminantes emergentes, podem ser classificados como poluentes orgânicos persistentes, produtos de higiene pessoal, produtos farmacêuticos, disruptores endócrinos e nanopartículas (USEPA, 2010a). Os contaminantes classificados como disruptores endócrinos, também conhecidos como desreguladores endócrinos ou interferentes endócrinos, são compostos de origem natural ou sintética que podem mimetizar ou interferir com as funções normais dos hormônios no organismo. Os disruptores endócrinos podem ligar, desligar ou modificar os sinais transduzidos pelos hormônios, o que pode afetar as funções de órgãos e tecidos. Além disso, muitas dessas substâncias têm sido associadas a efeitos adversos sobre o desenvolvimento, reprodução, sistema nervoso e imunológico em humanos. Uma grande variedade de substâncias (naturais ou sintéticas) pode atuar como interferente endócrino, incluindo fármacos, dioxinas, bifenilas policloradas, praguicidas e os plastificantes tais como o bisfenol A (NIH, 2015).

1.2. Bisfenol A

O Bisfenol A (BFA), 2,2-bis (4,4'dihidroxifenil) propano, (Figura 1) é um dos produtos químicos de maior volume de produção mundial, com mais de 2,7 milhões de toneladas produzidas a cada ano e mais de 100 toneladas liberadas para a atmosfera pela produção anual (REZG et al, 2014).

Figura 1. Estrutura química do Bisfenol A (BFA).

O BFA é usado principalmente como um monômero na produção de policarbonato e em resinas epóxi. Os policarbonatos são polímeros que apresentam alta transparência e resistência térmica e mecânica, formados pela reação do BFA com fosfogênio, (Figura 2). Estes polímeros podem ser encontrados em embalagens recicláveis para armazenamento de alimentos e bebidas como recipientes para micro-ondas, garrafas plásticas, mídias óticas como os CDs e DVDs, equipamentos automotivos, equipamentos elétricos e eletrônicos, equipamentos médicos, equipamentos esportivos e muitos outros produtos (OECD, 2012). Por outro lado, resinas epóxi são utilizadas como revestimento interno de proteção em latas de alimentos e bebidas, sendo muitas destas sintetizadas pela condensação de BFA com epicloridrina para formar BFA diglicil éter (Figura 3). Quando ocorre polimerização incompleta, o BFA residual da resina epóxi pode sofrer hidrólise sob condições ácidas ou básicas, e ser liberado para o recipiente, contaminando os alimentos nele armazenados (VANDENBERG et al, 2009).

Figura 2. Reação de formação do polycarbonato

Figura 3. Reação de formação da resina époxi

Uma outra importante aplicação do BFA é na produção de papéis termossensíveis, os quais possuem diversas aplicações comerciais, incluindo recibos de pontos de venda (recibos de caixas registradoras, caixa eletrônico e agências bancárias), rótulos (de medicamentos, etiquetas de código de barras, etiquetas de bagagens, rótulo de embalagem de alimentos empacotados e

etiquetas de preço), bilhetes (de transporte (companhias aéreas, rodoviárias, metroviárias, ferroviárias), de entretenimento (cinema, teatro, museus, eventos esportivos, parque de diversões, arenas)) e papéis impressos a partir de dispositivos de registro (NASHUA CORPORATION, 2015).

O papel termossensível usado no processo de impressão consiste basicamente em duas camadas: o papel base e uma camada termossensível (Figura 4). O papel base é geralmente uma formulação de papel padrão, funciona como suporte, e o papel termossensível que é composto de três componentes: uma tinta termocrômica, um revelador e um solvente (MENDUM et al, 2011). A combinação desses materiais e suas propriedades determina a coloração, as características da imagem, bem com sua durabilidade.

Figura 4. Esquema do papel termossensível e do processo de impressão (adaptado de MENDUN et al, 2011).

O principal revelador utilizado é o BFA, embora atualmente existem alternativas ao seu uso (BJÖRNSDOTTER et al, 2017). Um revelador é uma substância fracamente ácida, cuja função é transferir prótons para a tinta termocrômica, promovendo a formação da cor (MENDUN, 2011).

A tinta termocrômica tipicamente utilizada em papel termossensível é um corante leuco, principalmente as espirolactonas que, durante o processo de impressão são aquecidas promovendo a fusão dos componentes, transferência de prótons do revelador para o corante, fazendo com que esta molécula de corante sofra uma alteração estrutural que resulta na produção de cor (USEPA, 2014). A Figura 5 mostra um esquema da reação genérica entre o BFA e um corante leuco.

Figura 5. Reação reversível entre BFA e corante leuco (adaptado de BJÖRNSDOTTER et al, 2017)

Apesar de não ser encontrado naturalmente no meio ambiente, o BFA é frequentemente detectado em todos os compartimentos ambientais, devido a sua alta produção e utilização tornando-se uma preocupação, uma vez que vários efeitos adversos têm sido associados à esta substância (REZG et al, 2014; BJÖRNSDOTTER et al, 2017).

Como citado anteriormente, o BFA é considerado um desregulador endócrino, pois é capaz de interferir no sistema hormonal por diferentes mecanismos, promovendo, em mulheres, uma série de efeitos adversos tais como infertilidade, síndrome do ovário policístico, endometriose, abortos espontâneos, câncer de mama (ROCHESTER et al, 2013). Em homens, foi observada redução da função sexual masculina (ereção, orgasmo, desejo sexual), redução da qualidade do esperma, além de diminuição dos níveis de testosterona e da contagem de espermatozoides (ROCHESTER et al, 2013). Além disso, o BFA vem tendo um importante papel na etiologia de algumas doenças crônicas como diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares, problemas congênitos, distúrbios comportamentais, hipertensão, alteração na função renal e obesidade (ROCHESTER et al, 2013; BJÖRNSDOTTER et al, 2017).

Há múltiplas fontes que contribuem para a exposição humana ao BFA, incluindo água, solo, poeira, alimentos e bebidas (BJÖRNSDOTTER et al, 2017; HAMMARLING et al, 2000; LIAO et al, 2014; ZHOU et al, 2015; YANG et al, 2014; Wu et al, 2010), sendo a dieta, a principal via de exposição (SCHECTER et al, 2010a; GUART et al, 2011). Entretanto uma importante via de exposição que vem sendo estudada atualmente é a absorção dérmica. Alguns estudos têm demonstrado que o BFA pode ser absorvido pela pele durante a manipulação de alguns tipos de papéis

(BIEDERMANN et al, 2010; SCHREDER et al, 2010b; LIAO et al, 2011; Lu et al, 2013; GUEENS et al, 2012), principalmente os papéis termossensíveis, que apresentam concentrações elevadas de BFA (MENDUN et al, 2011; Lu et al, 2013; GUEENS et al, 2012; ROCHA et al, 2015; LIAO et al, 2011; RUSSO et al, 2017).

Além dos papéis termossensíveis serem potenciais fontes de exposição humana ao BFA, eles também podem contaminar outros tipos de papéis, uma vez que o BFA pode ser introduzido no ciclo de produção do papel. Além disso, cerca de 30% do papel termossensível produzido entra no processo de reciclagem (EUROPEAN COMMISSION, 2010). Segundo o estudo realizado por Gehring e colaboradores., alguns desses papéis podem apresentar concentrações elevadas de BFA, como de 2 a 430 mg.kg⁻¹ em papel higiênico (100% reciclado) e de 0,093 a 5,1 mg.kg⁻¹ em papéis descartados no lixo (revistas, flyers, jornais, etc) (GEHRING, 2004). Além disso, o BFA presente nos papéis termossensíveis também pode ser transferido e contaminar outros tipos de papéis, toda vez que são colocados em contato ou manipulados juntos. Um estudo realizado por Liao e Kannan (LIAO et al, 2011), mostrou que cédulas de dinheiro de diversos países estavam contaminadas por BFA e os papéis termossensíveis foram sugeridos como potenciais fontes de contaminação para as cédulas (SCHEDER et al, 2010; LIAO et al, 2011).

Dessa maneira, papéis termossensíveis, cédulas de dinheiro e outros tipos de papel constituem uma importante fonte de exposição humana ao BFA.

1.3 Compostos alternativos ao BFA

Em agosto de 2015, a *USEPA (United States Environmental Protection Agency)* divulgou uma lista das alternativas para o uso de BFA em papéis termossensíveis, que incluem 19 possíveis substitutos (USEPA, 2015).

As propriedades físicas requeridas para funcionar como um revelador incluem acidez, solubilidade em água e ponto de fusão que também pode resultar em comportamento tóxico semelhante. Muitas destas possíveis substituições são análogos estruturais do BFA. Alguns deles contêm enxofre como uma conexão entre os grupos fenólico, como por exemplo o bisfenol S (BFS).

1.4. Bisfenol S

Com o resultado das crescentes evidências do potencial tóxico do BFA sobre a saúde humana e ambiente (ROCHESTER et al, 2013; ROCHESTER et al, 2015), a *European Food Safety Authority (EFSA)* reduziu a ingestão diária tolerável (*TDI*) de BFA para 0,004 miligramas por kg de peso corporal (EFSA, 2015). Porém, esse valor estabelecido é temporário e depende de resultados de estudos a longo prazo, que ajudarão a reduzir as incertezas sobre os potenciais riscos à saúde. Além disso, para materiais em contato com alimentos, o Regulamento (UE) Nº 10/2011/EU da Comissão Europeia, estabelece um limite de migração específico de 0,6 mg por kg de alimento (Jornal oficial da União Europeia, 2011). Devido a essas limitações quanto ao uso do BFA, muitas indústrias estão gradativamente substituindo-o por compostos análogos, principalmente o BFS (4,4'-sulfonilbisfenol) (Figura 6), que ainda não possuem valores limites estabelecidos e vêm sendo utilizados, por exemplo, pelas indústrias produtoras de papéis termossensíveis ("*BPA – free*"), (LIAO et al, 2012). Porém, ainda existe uma preocupação em relação a toxicidade dos análogos do BFA, podendo esses produtos químicos serem tão prejudiciais ou mais que o composto original. Por exemplos, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que assim como o BFA, o BFS possui potencial citotóxico e genotóxico, em células DT40 de frangos (LEE et al, 2013), é capaz de diminuir a secreção basal de testosterona (ELADAK et al, 2015) e atuar como ligante no receptor estrogênico (YAMASAKI et al, 2004).

Figura 6. Bisfenol S (BFS)

1.5. Métodos analíticos para determinação de BFA

A determinação de BFA é dificultada pela variedade de matrizes em que esse composto é encontrado. A maioria dos métodos para a determinação do BFA utiliza alguma forma de extração para eliminar a interferência da matriz e pré-concentrar o analito. Os métodos de extração propostos baseiam-se principalmente na extração líquido-líquido (LLE) e extração em fase sólida (SPE). LLE é a técnica mais popular de preparo de amostra, devido a sua facilidade de aplicação. A SPE baseia-se no uso de uma superfície sólida, geralmente C18 ou C18 modificada como adsorvente. (RYKOWSKA et al, 2006).

Após o procedimento de extração, as amostras são geralmente analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ou cromatografia gasosa (GC) com diversos sistemas de detecção (espectrometria de massas, fluorimetria e UV/VIS), (RYKOWSKA et al, 2006).

Apesar do uso frequente da técnica de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS) para determinação de BFA em amostras de papéis, as concentrações elevadas geralmente encontradas na ordem de $\mu\text{g.g}^{-1}$ a mg.g^{-1} , denotam a não necessidade de uma técnica altamente sensível e de relativo alto custo para monitorar esse analito. Devido as características estruturais dessa molécula (presença de anéis aromáticos com elétrons altamente conjugados) o BFA apresenta alto potencial para a determinação por fluorescência (WANG et al, 2013; CHI, et al, 2015; SYED, et al, 2011). Técnicas como a espectroscopia de fluorescência (fluorescência sincronizada) apresentam razoável sensibilidade, são de relativo baixo custo e de simples operação, quando comparadas ao LC-MS/MS, e podem ser utilizadas como alternativas para a determinação simultânea de múltiplos analitos devido às suas características, como estreitamento da banda espectral, simplificação do espectro de emissão e contração da faixa espectral (LI et al, 2010).

2. Fundamentação teórica

2.1. Luminescência

A luminescência é um termo genérico para a emissão de luz que não é um efeito da alta temperatura. Um corpo quente que emite radiação somente por causa de sua alta temperatura é chamado de incandescente. Qualquer outra forma de emissão de luz é chamada luminescência (PERKINELMER, 2000). Todas as formas de luminescência necessitam de alguma absorção de energia para que ocorra a emissão de luz. Baseado nesse princípio, os fenômenos de luminescência são classificados de acordo com a fonte e a natureza da luz de excitação em: fotoluminescência (fluorescência e fosforescência), quimioluminescência (bioluminescência), cristalloluminescência, eletroluminescência, radioluminescência e termoluminescência (PRINCETON INSTRUMENTS, 2016; NIGHTSEA, 2016; FÖLL, 2017).

2.1.2. Fluorescência

Nos últimos anos, tem ocorrido um notável crescimento da utilização da espectroscopia de fluorescência como uma ferramenta aplicada nas mais variadas áreas. Por exemplo, a Fluorescência é uma das principais ferramentas de pesquisa aplicada nas áreas de bioquímica e biofísica. Recentemente a fluorescência passou a ser uma técnica bastante utilizada na área da biotecnologia, citometria de fluxo, kits de diagnóstico, PCR, ELISA, sequenciamento de DNA, análises forenses e genéticas (LAKOWICZ, 2006; BRIGHT, 1988; SHAHZAD et al, 2009; RAMKRISHNA, 2010; NARESH, 2014).

Fluorescência é um processo de emissão de fótons que ocorre durante a relaxação molecular a partir do estado excitado, e envolve transições entre níveis eletrônicos e vibracionais do fluoróforo (molécula poliatômica fluorescente). O diagrama de Jablonski (Figura 7) oferece uma representação dos níveis de energia e das principais transições eletrônicas. Níveis eletrônicos estão geralmente separados por energias na ordem de 10.000 cm^{-1} . Cada nível eletrônico é dividido em múltiplos subníveis, que representam os níveis vibracionais da molécula. A energia de cada

nível vibracional é separada por cerca de 100 cm^{-1} (SO et al, 2002).

Figura 7. Diagrama de Jablonski. mostrando os principais níveis de energia e alguns dos processos que ocorrem durante (a) absorção de radiação incidente, (b) relaxação não-radiativa e (c) emissão fluorescente por espécies moleculares. (Skoog, 2006).

As moléculas comuns que não sejam radicais livres existem no estado fundamental com seus *spins* de elétrons emparelhados. Um estado eletrônico molecular no qual todos os *spins* dos elétrons estão emparelhados é denominado estado singlete. Quando um elétron de um par de elétrons é excitado para um nível de maior energia, um estado singlete ou tripleto pode ser produzido. No estado excitado singlete, o *spin* do elétron promovido é oposto ao do estado fundamental. No estado tripleto, contudo, os *spins* dos dois elétrons tornam-se desemparelhados, ocorre a inversão do *spin* (SKOOG et al., 2006).

A fluorescência envolve a transições de um estado excitado singlete para o estado fundamente singlete. A molécula no menor nível vibracional do estado fundamental é excitada e passa a ocupar um nível vibracional acessível no estado excitado. Após a excitação, a molécula rapidamente relaxa para o menor nível vibracional do estado excitado. Esse processo ocorre na escala de 10^{-15} a 10^{-12} segundos e é denominado de conversão interna. A conversão interna é responsável pelo deslocamento de Stokes (YANG et al, 1993). O deslocamento de Stokes pode

ser definido como a diferença de energia ou comprimento de onda entre o máximo de absorção e o máximo de emissão, descreve a observação de que a fluorescência ocorre em um comprimento de onda maior que o comprimento de onda de excitação.

A fluorescência predominantemente ocorre do menor nível vibracional do estado excitado, uma vez que, a conversão interna (10^{-12} s) ocorre com muito mais rapidez do que a fluorescência (10^{-9} s), isso é enunciado pela Regra de Kasha (KASHA, 1950; KASHA et al, 1956).

O fluoróforo permanece no menor nível vibracional do estado excitado por um período na ordem de 10^{-9} segundos, conhecido como tempo de vida de fluorescência (BEREZIN et al, 2010). A emissão da fluorescência ocorre quando o fluoróforo decai do estado excitado singleto para um nível permissível do estado fundamental singleto emitindo um fóton.

2.1.2.1. Instrumentação

A medida do sinal de fluorescência fornece um método sensível de monitoramento do fluoróforo. Instrumentos têm sido desenvolvidos para medir intensidade, espectro, tempo de vida e polarização. Medidas de intensidade de fluorescência permitem determinar a presença ou ausência do fluoróforo bem como sua concentração. (LAKOWICZ, 2006; BRIGHT, 1988; SHAHZAD et al, 2009; RAMKRISHNA, 2010; NARESH, 2014).

Um espectrofluorímetro, em geral, apresenta: a) uma fonte de luz, (lâmpada de xenônio) de excitação, utilizada devido a sua alta intensidade e emissão contínua de luz de 250 a 700 nm; b) dois monocromadores, para que possam ser selecionados os comprimentos de onda de excitação e emissão. Os monocromadores são utilizados para dispersar a luz policromática em vários comprimentos de onda por meio do uso de prismas ou rede de difração (SKOOG et al, 2006; SO et al, 2002). A performance do monocromador inclui um baixo nível de dispersão da luz para evitar problemas devido ao espalhamento da luz (LAKOWICZ et al, 2006; SO et al, 2002). A largura da fenda é geralmente variável, e um monocromador típico terá tanto uma fenda de entrada quanto uma de saída. A intensidade da luz que passa através do

monocromador é aproximadamente proporcional ao quadrado da largura da fenda. Uma largura de fenda maior, aumenta o nível de sinal e diminui a resolução; uma largura de fenda menor, aumenta a resolução, porém, diminui a intensidade (LAKOWICZ et al, 2006; SO et al, 2002). A escolha da largura da fenda então deve ser realizada com base num equilíbrio entre resolução e intensidade. A fluorescência é detectada por meio de uma fotomultiplicadora, e pode ser considerada como uma fonte de corrente proporcional a intensidade da luz. Uma fotomultiplicadora é um tubo de vácuo que consiste em uma janela de entrada, um fotocatodo, eletrodos de focalização, um multiplicador de elétrons e um anodo, geralmente selados em um tubo de vidro sob vácuo (HAMAMATSU, 2007). A luz que entra na fotomultiplicadora é detectada e produz um sinal de saída através dos seguintes processos: a) a luz passa pela janela de entrada; b) a luz excita os elétrons no fotocatodo (negativo) para que os fotoelétrons sejam emitidos no vácuo; c) os fotoelétrons são acelerados e focados pelo eletrodo de focalização no primeiro dinodo, onde são multiplicados por meio de emissão de elétrons secundários (HAMAMATSU, 2007). Essa emissão secundária é repetida em cada um dos dinodos; d) os elétrons secundários multiplicados e emitidos pelo último dinodo são finalmente coletados pelo anodo gerando uma corrente elétrica (HAMAMATSU, 2007).

2.1.2.2. Fluorescência sincronizada

A espectroscopia de fluorescência é uma técnica altamente sensível, não destrutiva, de relativo baixo custo e de simples operação, que pode ser utilizada para determinação de composto fluorescentes. Entretanto, esta técnica não tem sido utilizada em amostras complexas, para a determinação de múltiplos analitos, devido aos problemas de sobreposição dos espectros de excitação e/ou emissão, necessitando de um procedimento de pré-separação antes da análise da amostra (LI et al, 2010; PATRA et al, 2002). Isso pode ser resolvido utilizando a fluorescência sincronizada, onde a sobreposição dos espectros pode ser minimizada.

Na espectroscopia de fluorescência convencional, dois tipos de espectros são geralmente obtidos. Quando uma amostra é excitada em um comprimento de onda (λ_{ex}) fixo, um espectro de emissão é produzido por registro da intensidade de emissão

em função do comprimento de onda de emissão (λ_{em}) (PATRA et al. 2002).

Um espectro de excitação pode ser obtido quando comprimento de onda de excitação (λ_{ex}) é escaneado, enquanto o comprimento de onda de emissão (λ_{em}) é fixo. Na espectroscopia de fluorescência sincronizada, o comprimento de onda de excitação (λ_{ex}) e o comprimento de onda de emissão (λ_{em}) são escaneados simultaneamente (LI et al, 2010; PÍŠ et al, 2012) (Figura 8).

Figura 8. Diferentes espectros de fluorescência. (1) espectro de excitação; (2) espectro de emissão; (3) espectro de fluorescência sincronizada (adaptado de LI et al, 2010).

Dependendo da velocidade de escaneamento três tipos básicos da técnica de espectroscopia de fluorescência sincronizada são possíveis (PATRA et al, 2002):

- Espectroscopia de fluorescência sincronizada de comprimento de onda constante: introduzida por Lloyd em 1971, é uma técnica muito simples e a mais utilizada. Em nas situações em que a fluorescência de um composto é mascarada pelo espalhamento de Rayleigh, esta técnica permite uma melhora nas medidas em relação ao método convencional, desde que o intervalo no comprimento de onda ($\Delta\lambda$) sejam apropriadamente selecionados, os quais podem ser rápida e convenientemente determinados a partir de gráficos tridimensionais (PATRA et al, 2002; SOTOMAYOR et al, 2008). Nessa técnica a velocidade de escaneamento é mantida constante em ambos os monocromadores e, portanto, um intervalo constante no comprimento de onda, $\Delta\lambda$, é mantido entre λ_{em} e λ_{ex} .

- Espectroscopia de fluorescência sincronizada de ângulo variável, os comprimentos de onda de excitação e emissão podem ser variados simultaneamente, mas, a

velocidades diferentes. Essas diferentes velocidades permitem a construção de planos em ângulos entre $+90^\circ$ e -90° ao eixo X de excitação em toda a extensão do espectro completo. Esta técnica é mais seletiva e foi proposta por Kubic em 1980, e tem sido aplicada à determinação simultânea das vitaminas B2 e B6, na determinação simultânea dos diuréticos, furosemida, triantereno e piretanida, assim como em amostras ambientais de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (SOTOMAYOR et al, 2008).

- Espectroscopia de fluorescência de energia constante é uma técnica desenvolvida por Inman e Winefordner em 1982, implica no escaneamento simultâneo de ambos monocromadores enquanto a diferença no número de onda ($\Delta\nu$) é mantida constante entre eles. Os valores de $\Delta\nu$ são selecionados de acordo com as características dos níveis vibracionais dos compostos de interesse. Espectroscopia de fluorescência de energia constante oferece uma melhora significativa na sensibilidade e seletividade comparado com a espectroscopia de fluorescência sincronizada de comprimento de onda constante, que é a técnica mais utilizada dentre as espectroscopias de fluorescência sincronizada (PATRA et al, 2002; EIROA et al, 2000).

As principais características da fluorescência sincronizada são o estreitamento da banda espectral, simplificação do espectro de emissão e contração da faixa espectral. A comparação dos espectros de emissão, excitação e fluorescência sincronizada é representada na Figura 9.

Figura 9. Espectro de emissão, excitação e fluorescência sincronizada do Perileno ($C_{20}H_{12}$) (adaptado de PATRA, 2002)

Devido as características do espectro, a fluorescência sincronizada vem sendo utilizada como uma metodologia simples e efetiva para a obtenção de dados de vários compostos em uma única medida, permitindo a análise de amostras biológicas (EL-ENANY et al, 2009; PULGARÍN et al, 2012; ELMANSI et al, 2016; NI et al, 2008; LI et al, 2009), ambientais (HUA et al, 2006; LIU et al, 2006), petroquímicas (XIA et al, 2006; RYDER et al, 2004; LAGE-YUSTY et al, 2005; HE et al, 2005) e alimentos (PÍŠ et al, 2011; PATRA et al, 2011; PULGARÍN et al, 2014; SIKORSKA et al, 2006; ZHOU et al, 2011), sem a necessidade de uma etapa prévia de pré-separação.

3. Validação de métodos analíticos

A necessidade de se mostrar a qualidade dos dados obtidos, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, vem sendo cada vez mais reconhecida e exigida atualmente. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir à uma tomada de decisão incorreta e causar danos irreparáveis. Para garantir que um método analítico gere informações confiáveis sobre determinada amostra, ele deve ser submetido a um processo de avaliação denominado validação. A validação de um método é um processo contínuo que se inicia no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo desenvolvimento e aplicação (RIBANI, 2004).

Recomendações gerais para a validação de métodos analíticos podem ser obtidas de institutos, órgãos e agências internacionais como da *Food and Drug Administration* (FDA), *International Conference on Harmonization* (ICH), *World Health Organization* (WHO) e nacionais como do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), além da existência de diversas publicações científicas sobre o assunto (FDA, 2011; ICH, 2000; WHO, 2006; INMETRO, 2007; ANVISA, 2003).

Há várias definições para a validação, como por exemplo:

- Segundo definição da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003), a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados.
- Para o *Food and Drug Administration* (FDA, 2011): A validação é a coleta e avaliação

de dados a partir da etapa de planejamento do processo e por toda produção, a qual estabelece evidências científicas de que um processo é capaz de sempre fornecer produtos de qualidade.

- O processo de validação pode ser definido como evidências documentadas de que o processo, operado dentro dos parâmetros estabelecidos, pode realizar de forma eficaz e reprodutiva a produção de um medicamento que atenda às especificações pré-estabelecidas e atributos de qualidade, conceito dado pelo *International Conference on Harmonisation* (ICH, 2000)

- A *World Health Organization* (WHO, 2006) define processo de validação como “as evidências documentas que promovem alto grau de garantia de que um processo específico resultará consistentemente em um produto que atenda às suas especificações predeterminadas e características de qualidade.

- Para o Instituto Nacional de Metrologia e, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO, 2007) a validação é a comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos.

4. Objetivos

a) Desenvolver, otimizar e validar um método analítico simples e rápido para a determinação de BFA em papéis utilizando a técnica de espectroscopia de fluorescência (fluorescência sincronizada)

b) Aplicar o método desenvolvido e validado na determinação e quantificação do BFA em amostras de papéis termossensíveis, bem como de outros tipos de papéis.

Objetivos específicos:

Etapa 1- Otimização das condições de trabalho do equipamento.

As condições a serem otimizadas foram: tipo de escaneamento (emissão, excitação, sincronizado), velocidade de escaneamento (*scan rate*), fenda de excitação (*excitation slits*), fenda de emissão (*emission slits*), faixa de varredura (*range*),

intervalo de comprimento de onda ($\Delta\lambda$).

Etapla 2- Validação do método

Os parâmetros analíticos avaliados no processo de validação foram: seletividade; linearidade; precisão; exatidão; recuperação; limite de detecção; limite de quantificação.

Etapla 3- Aplicação do método desenvolvido na determinação de BFA em amostras de papéis termossensíveis e outros tipos de papéis.

Etapla 4- Comparação dos resultados obtidos nas amostras de papel analisadas com aqueles obtidos por LC-MS/MS (Rocha et al., 2015).

5. Material e métodos

No presente trabalho, além do desenvolvimento da metodologia, o método foi validado, considerando parâmetros preconizados (seletividade, linearidade, precisão, exatidão, recuperação, limite de detecção e limite de quantificação) pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através da Norma Regulamentadora nº899, de 29 de maio de 2003, como descrito a seguir:

5.1. Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito dentro de uma determinada faixa. (RIBANI, 2004). A maioria das técnicas espectrométricas apresentam uma relação de primeira ordem, ou seja, linear, entre a resposta do detector (y) e a concentração do analito (x), podendo ser descrita pela equação de regressão linear $y = ax + b$, onde a é a inclinação da reta e b é a intersecção ao eixo y . Além dos coeficientes de regressão a e b , também é possível calcular o coeficiente de correlação r . Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, valores próximos de 1,0, indicam uma menor dispersão dos dados e menor incerteza dos coeficientes de regressão estimados (RIBANI, 2004). A ANVISA recomenda um critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) de 0,99.

5.2. Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (ANVISA, 2003). Representa a dispersão de resultados entre ensaio independentes, repetidos de uma mesma amostra, sob condições definidas (RIBANI, 2004).

A precisão em validação de métodos é considerada em três níveis diferentes: repetibilidade; precisão intermediária e reprodutibilidade.

5.2.1. Repetibilidade

A repetibilidade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas condições de repetibilidade: mesmo procedimento; mesmo instrumento; mesmo analista; repetições dentro de um curto período de tempo (RIBANI, 2004).

A repetibilidade envolve várias medições de uma mesma amostra e pode ser expressa como estimativa do desvio padrão relativo (RSD), também conhecido com coeficiente de variação (CV).

$$\text{RSD (\%)} \text{ ou } \text{CV (\%)} = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

s é o desvio padrão absoluto; $\bar{x}$ é a média aritmética das medições

5.2.2. Precisão intermediária

A precisão intermediária indica a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, aponta os efeitos de variações devido a diferentes dias de análise, diferentes analistas ou diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores. O objetivo da validação intermediária é verificar se no mesmo laboratório, sobe as mesmas condições, o método fornecerá os mesmos resultados (RIBANI, 2004; ANVISA, 2003). A precisão intermediária também pode ser expressa através da estimativa do RSD.

5.2.3. Reprodutibilidade

A reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados obtidos das medições de uma amostra, efetuadas sob condições variadas (diferente analista, laboratório, equipamento, etc.) (RIBANI, 2004). A reprodutibilidade também pode ser expressa através da estimativa do RSD.

O valor máximo aceitável para a precisão, deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra (compostos em macro quantidades ou análise de traços e impurezas) o tipo de matriz e a finalidade do método.

5.3. Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (ANVISA, 2003). Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (RIBANI, 2004).

O número de ensaios para a exatidão varia segundo a legislação ou diretriz adotada e também a característica do estudo. A Anvisa estabelece um mínimo de nove determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, em três diferentes níveis de concentração.

A exatidão de um método pode ser avaliada através de ensaios de recuperação. A recuperação (ou fator de recuperação), R, é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada (RIBANI, 2004). Para validação da metodologia a ANVISA recomenda que se trabalhe com no mínimo nove determinações contemplando a faixa linear do método. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente:

$$Exatidão = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

O intervalo de recuperação (exatidão) aceitável é função da concentração e da finalidade da análise. O guia da *Association of Analytical Communities* (AOAC, 2002) estabelece uma tabela com esses limites, relacionando a concentração com o limite de recuperação. Para concentração na ordem de $\mu\text{g.L}^{-1}$ o intervalo aceitável está entre 70 e 125%, podendo esses valores serem modificados, dependendo do tipo e finalidade do ensaio.

5.4. Recuperação

A recuperação de um analito em um ensaio é a resposta do detector obtida a partir de uma quantidade de analito adicionada e extraída da matriz, comparada com a resposta do detector para a concentração verdadeira do padrão puro. Também pode ser entendido como a porcentagem do analito recuperável após um procedimento químico (UNODC, 2009). A recuperação de um método analítico é melhor estabelecida pela resposta de uma amostra extraída em concentrações baixas, médias e altas (tipicamente aquelas utilizadas para avaliar a precisão e exatidão do método). Embora recuperações próximas a 100% sejam desejáveis, recuperações menores também podem ser aceitas, desde que sejam mantidas a precisão e exatidão (UNODC, 2009).

5.5. Limite de detecção

O limite de detecção (LD) pode ser definido como a menor concentração do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado, sob determinadas condições experimentais (RIBANI, 2004; ANVISA, 2003). O LD pode ser calculado baseado nos parâmetros da curva analítica, segundo a equação,

$$LD = 3 \times \frac{s}{S}$$

Onde s é a estimativa do desvio padrão do branco e S é a inclinação (“*slope*”) ou coeficiente angular da curva analítica (ANVISA, 2003).

5.6. Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração do analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis sob determinadas condições experimentais. Pode ser expresso pela equação,

$$LD = 10 \times \frac{s}{S}$$

Onde s é a estimativa do desvio padrão do branco e S é a inclinação (“*slope*”) ou coeficiente angular da curva analítica (ANVISA, 2003).

5.7. Seletividade

A seletividade é o grau em que um método pode quantificar o analito com precisão e exatidão, na presença de interferentes, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Idealmente, a seletividade deve ser avaliada para qualquer potencial interferente que possa estar presente na amostra (THOMPSON et al, 2002; ANVISA, 2003).

Uma maneira de se avaliar a seletividade é através do método de adição de padrão, comparando duas curvas analíticas, uma com e outra sem a presença da matriz. Confronta-se então as duas curvas analíticas e caso elas sejam paralelas, ou seja, apresentem o mesmo coeficiente angular (α), pode-se dizer que não há interferência da matriz na determinação da substância de interesse, portanto o método é seletivo (RIBANI, 2004).

5.8. Padrões e reagentes

Os padrões de BFA, BFS e BFA-*d*16 (> 99% de pureza) e o solvente metanol anidro (grau hplc) foram obtidos da Sigma-Aldrich (EUA). A água utilizada no estudo (água deionizada de alta pureza, resistividade 18,2 MΩcm) foi obtida através do sistema Milli-Q (Millipore®) de purificação de água (Millipore Co. França).

5.9 Preparo das soluções

5.9.1. Linearidade

O BFA foi inicialmente pesado a partir do padrão sólido com alto grau de pureza ($\geq 99\%$) para o preparo de uma solução estoque de 2 mg.mL^{-1} em metanol. Foram pesados 20 mg do padrão e diluído em 10 mL de metanol. A partir desta foi feita uma solução intermediária de 5 mg.L^{-1} para posterior preparo das soluções de trabalho nas concentrações de 25, 50, 100, 250, 300 e $450 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$.

5.9.2. Precisão e exatidão

Também foram preparadas soluções para avaliação dos parâmetros precisão e exatidão nas concentrações de 25, 250 e $450 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$ (níveis baixo, médio e alto), diluídas a partir da solução intermediária de 5 mg.L^{-1} .

5.9.3. Recuperação

Para o ensaio de recuperação foram preparadas soluções branco com adição de padrão “nas concentrações de 25, 250 e $450 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$ (baixa, média e alta) preparadas pela diluição de uma solução intermediária de 5 mg.L^{-1} e soluções preparadas a partir de um papel previamente extraído (papel branco, livre de BFA) adicionado de padrão, nas concentrações de 25, 250 e $450 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$, preparadas a partir de diferentes volumes de uma solução intermediária de 250 mg.L^{-1} adicionada diretamente sobre o papel e submetidas ao mesmo procedimento de extração das amostras.

5.9.4. Seletividade

Foram preparadas duas curvas analíticas, uma com a presença da matriz, preparada a partir de uma amostra de papel previamente extraído no qual foi adicionado diferentes volumes de uma solução intermediária de 250 mg.L^{-1} de BFA

diretamente sobre o papel e submetido ao mesmo procedimento de extração das amostras, de modo que as soluções obtidas após a diluição (100 vezes) eram de 25, 50 100 300 e 450 $\mu\text{g.L}^{-1}$, e uma segunda, sem a presença da matriz (curva seca) nas concentrações de 25, 50, 100, 250, 300 e 450 $\mu\text{g.L}^{-1}$, preparada a partir de uma solução intermediária de 5 mg.L^{-1} de BFA.

A fim de encontrar a concentração máxima de BFS que não interfere na quantificação do BFA foram preparadas soluções 0,1 mg.L^{-1} BFA e 0,1 mg.L^{-1} BFS puros e soluções contendo 0,1 mg.L^{-1} BFA mais 0,01; 0,03; 0,05; 0,08; 0,1; 1,0; 10; 25; 50; 75 e 100 mg.L^{-1} de BFS. As soluções de menor concentração (0,01; 0,03; 0,05; 0,08; 0,1; 1,0 mg.L^{-1}) foram preparadas a partir de soluções intermediárias de 5 mg.L^{-1} de BFA e BFS; as soluções de maior concentração (10; 25; 50; 75 e 100 mg.L^{-1}) foram preparadas diretamente de cada solução estoque de 2,0 mg.mL^{-1} de BFA e BFS, respectivamente.

5.9.5. Eficiência da extração

Para testar a eficiência do processo de extração, três diferentes amostras de papel foram submetidas a quatro extrações consecutivas e foi realizada a leitura da intensidade do sinal do BFA para cada extração. As concentrações foram determinadas confrontando as intensidades obtidas com a equação da reta de uma curva analítica nas concentrações de 25, 50, 100, 250, 300 e 450 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

5.10. Otimização do $\Delta\lambda$ para fluorescência sincronizada

Os testes de otimização do $\Delta\lambda$ foram conduzidos utilizando soluções padrão de BFA 0,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e BFS 1,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Foram pesados 20 mg de cada um dos padrões de BFA e BFS (separadamente) e diluídos em 10 mL de metanol. A partir destas, foram feitas soluções intermediárias de 5 mg.L^{-1} para posterior preparo das soluções acima (BFA 0,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e BFS 1,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

5.11. Preparo das amostras

Papéis termossensíveis (n=341) de diferentes tipos foram randomicamente coletados de diferentes cidades do estado de São Paulo, incluindo recibos de pontos de venda, de cartão de credito, agências bancárias, cupons fiscais, etc.

Outros papéis e produtos de papéis (n=103) foram agrupados em 12 categorias: bilhete de loteria (n=7), bilhete de ônibus (n=5), *flyers* (n=10), (por exemplo, panfletos de promoções, anúncios, divulgação), revistas (n=9), envelopes (n=11), jornais (n=6), papel para alimentos (n=20), (papéis que ficam em contato com o alimento, por exemplo, embalagens *fast-food*, copos de papel, pratos de papel, embalagens de pizza), cartões de visita (n=12), papel para impressão (n=3), (papel sulfite A4), guardanapos (n=8), papel toalha (n=4) e papel higiênico (n=8).

Todas as amostras foram armazenadas em recipiente livre de BFA até as análises.

O preparo das amostras foi realizado seguindo o procedimento adotado por Rocha et al (2015) com algumas modificações. Para os papéis termossensíveis e demais tipos de papéis, um único círculo (diâmetro: 12 mm cada) no centro (C) de cada amostra foi recortado com um punção para papel. Depois de devidamente pesados (balança analítica Fa2104n – 210g x 0,0001g Bioprecisa) cada um dos círculos foi cortado em pequenos pedaços e transferido para tubos de polipropileno (Falcon®, BD) de 15 mL. Em seguida, 5mL de metanol foram adicionados e a mistura foi agitada em agitador de tubos tipo vortex (Vortex QI-901 – Biomixer) (60 s) e ultrassom (Ultrasonic cleaner 2840D) (10 min) e centrifugadas (Centribio 80 -2B) a 4500 x g por 3 minutos.

Uma alíquota de 100 µL foi transferida para um tubo de polipropileno e diluída com metanol para análise por fluorescência e uma outra alíquota de 20 µL foi transferida para outro tubo de polipropileno e diluída para 10 mL com Metanol:H₂O na proporção de 1:1 e enriquecida com BFA-d₁₆ como padrão interno (Sigma-Aldrich) para análise por LC-MS/MS. Essas soluções foram armazenadas a -20°C e antes da análise foram filtradas em filtros de 0.45 µm.

O esquema do procedimento de preparo de amostras na forma de diagrama de blocos é ilustrado na Figura 10.

* Para os papéis termossensíveis antes do procedimento de análise, foi realizada uma diluição, 100µL / 10 mL, para os demais papéis não houve necessidade de diluição.

Figura 10. Diagrama de blocos representando o procedimento de extração de bisfenol A e S em papéis.

5.12. Instrumentação

5.12.1. Espectrofluorímetro

Espectrofluorímetro (LS 55, Perkin Elmer, EUA) com capacidade de medição de fluorescência, fosforescência, quimiluminescência e bioluminescência. Possui como fonte uma lâmpada de descarga de xenônio, com potência de 20 kW por 8 μ s de duração. A detecção ocorre através de uma fotomultiplicadora modelo R928 (Red-Sensitive) que pode operar até 900 nm. A seleção dos comprimentos de onda é realizada por meio de monocromadores do tipo Monk-Gillieson, que cobre o intervalo de 200 a 800 nm para excitação e de 200 a 900 nm () para emissão. As fendas de excitação (2,5 - 15,0 nm) e emissão (2,5 - 20,0 nm) podem ser variadas e selecionadas em incrementos de 0,1 nm. Possui uma velocidade de escaneamento de 10–1500 nm/min, podendo ser selecionado em incrementos de 1 nm. A sensibilidade do equipamento é dada através da relação sinal:ruído (500:1 r.m.s), utilizando a banda Raman da água, com excitação em 350 nm e fenda de excitação e emissão de 10 nm.

Escaneamento sincronizado com comprimento de onda constante ou com diferença de energia constante, são modos de aquisição de dados também disponíveis nesse equipamento, com uma exatidão do comprimento de onda: $\pm 1,0$ nm e uma reprodutibilidade do comprimento de onda: $\pm 0,5$ nm.

O software BL Studio versão 1.04.02 (BioLight Luminescence Systems Ltd.) foi utilizado para controle do instrumento; aquisição, armazenamento e processamento de dados.

As condições utilizadas para a fluorescência sincronizada de comprimento de onda constante na determinação do BFA foram: fenda de excitação (*excitation slits*) de 5.0 nm; fenda de emissão (*emission slits*) de 5.0 nm; faixa de varredura (*range*) de 200 a 400 nm; $\Delta\lambda$ 85 nm; velocidade de escaneamento (*scan rate*) de 1500 nm/min.

5.12.2. Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas

Para efeito comparativo foi utilizada a técnica de cromatografia Líquida acoplada a espectrometria de massas. Para isso foi utilizado procedimento descrito pelo nosso grupo de pesquis (Rocha et al., 2015). A separação, identificação e quantificação de BFA e BFS foram realizadas com o sistema Thermo Scientific LC equipado com uma bomba (Accela 600 pump) e um amostrador automático (Accela Autosampler), acoplado com um espectrômetro de massas triplo quadrupolo, modelo TSQ Quantum Access Max operando com fonte de ionização por electrospray. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna Supelco Ascentis Express C18 (Fused-Core) (Sigma-Aldrich) de 75 mm x 2,1 mm de diâmetro interno e com tamanho de partículas de 2,7 μm ; à uma temperatura da coluna foi 40°C, utilizando um modo de eluição por gradiente metanol:agua, com uma vazão da fase móvel de 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ e volume de injeção de 10 μL . Durante a eluição por gradiente, a fase móvel começou com uma proporção de 30% de MeOH até atingir 95% de MeOH em 3 minutos, mantendo-se esta porcentagem durante 2 min (3-5 min); até que foi finalmente revertida para 30% de MeOH e mantida durante 2 minutos antes da próxima injeção (tempo total de corrida de 7 min).

As condições do espectrômetro de massas foram: tensão do capilar (*capillary voltage*) mantido em -4 kV e temperatura do vaporizador (*vaporizer temperature*) em 395°C. A tensão do cone (*cone voltage*) foi fixado em -30 V. Para as análises espectrométricas, a molécula desprotonada $[\text{M-H}]^-$ foi utilizada como o íon precursor. Argônio foi utilizado como gás de dissociação induzida por colisão (CID, “*collision-induced dissociation*”) a uma pressão de 1,6 mTorr. O software Xcalibur versão 2.0 (Thermo Fisher Scientific) foi utilizado para controlar os instrumentos e processar os dados.

O modo de monitoramento de reações múltiplas no modo negativo foi utilizado para determinação dos analitos. Os canais de transição foram determinados após infusão direta, variando-se a energia de colisão (CE), obtendo-se assim o perfil de fragmentação dos compostos. As transições (m/z) obtidas monitoradas foram: 227 > 212 para BFA (CE 17); 249 > 108 para BFS (CE 26); 241 > 223 para BFA- d_{16} (CE 19).

6. Resultados e discussão

6.1. Espectro de emissão e excitação BFA e BFS

Utilizando soluções padrões de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ BFA e de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ BFS em metanol nas seguintes condições: velocidade de escaneamento (*scan rate*) de 1500 nm/min . fenda de excitação (*excitation slits*) de 5.0 nm ; fenda de emissão (*emission slits*) de 5.0 nm ; faixa de varredura (*range*) de 200 a 300 nm para o espectro de excitação e de 290 a 400 nm para o espectro de emissão, foram determinados os espectros de excitação e emissão para esses dois compostos, como mostrado nas Figuras 11 e 12 respectivamente.

De acordo com a Figura 11, o BFA apresenta dois picos de excitação, um em 230nm e outro em 280 nm; enquanto que para o BFS o máximo de absorção ocorre em 260 nm. Porém, a excitação de apenas um desses compostos na presença do outro não é possível, devido à sobreposição dos espectros de excitação, dificultando assim a análise simultânea dos mesmos.

Figura 11. Espectro de excitação BFA e BFS

Também foi determinado o espectro de emissão do BFA e BFS, ilustrado na Figura 12. Como verificado pela análise do espectro, o BFA, quando excitado em 230 nm, apresenta um pico de fluorescência com o máximo de emissão em 310 nm;

enquanto que, para o BFS, o máximo de emissão ocorre em 328 nm e sua intensidade de emissão é menor, quando comparada a do BFA. Assim como ocorre com os espectros de excitação, também ocorre a sobreposição dos espectros de emissão do BFA e do BFS, não sendo possível a análise simultânea desses compostos devido a interferência no sinal da fluorescência.

Figura 12. Espectro de emissão BFA e BFS.

6.2. Otimização do $\Delta\lambda$ para fluorescência sincronizada

Para minimizar os problemas relacionados a sobreposição dos espectros de excitação e emissão, pode ser utilizado a fluorescência sincronizada, que tem como característica o estreitamento da banda espectral, simplificação do espectro de emissão e contração da faixa espectral.

Os seguintes intervalos de comprimentos de onda ($\Delta\lambda$) foram aleatoriamente selecionados e testados: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 e 90 e 95 nm. Todos testes foram conduzidos utilizando padrão de BFA $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ e BFS $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol, nas seguintes condições: velocidade de escaneamento (*scan rate*) de 1500 nm/min. fenda de excitação (*excitation slits*) de 5,0

nm; fenda de emissão (*emission slits*) de 5,0 nm; faixa de varredura (*range*) de 200 a 400 nm.

As Figuras de 13 a 31 mostram os espectros obtidos para cada um dos valores de $\Delta\lambda$ testados.

Figura 13. Espectro de defluorescência sincronizada BFA e BFS em $\Delta\lambda = 5$ nm

Figura 14. Espectro de fluorescência sincronizada BFA e BFS em $\Delta\lambda = 10$ nm

Figura 15. Espectro de fluorescência sincronizada BFA e BFS em $\Delta\lambda = 15$ nm

Figura 16. Espectro de fluorescência sincronizada BFA e BFS em $\Delta\lambda = 20$ nm

Figura 17. Espectro de fluorescência sincronizada BFA e BFS em $\Delta\lambda = 25$ nm

Figura 18. Espectro de fluorescência sincronizada BFA e BFS em $\Delta\lambda = 30$ nm

Figura 19. Espectro de fluorescência sincronizada BFA e BFS em $\Delta\lambda = 35$ nm

Figura 20. Espectro de fluorescência sincronizada BFA e BFS em $\Delta\lambda = 40$ nm

Figura 21. Espectro de fluorescência sincronizada BFA e BFS em $\Delta\lambda = 45$ nm

Figura 22. Espectro de fluorescência sincronizada BFA e BFS em $\Delta\lambda = 50$ nm

Figura 23. Espectro de fluorescência sincronizada BFA e BFS em $\Delta\lambda = 55$ nm

Figura 24. Espectro de fluorescência sincronizada BFA e BFS em $\Delta\lambda = 60$ nm

Figura 25. Espectro de fluorescência sincronizada BFA e BFS em $\Delta\lambda = 65$ nm

Figura 26. Espectro de fluorescência sincronizada BFA e BFS em $\Delta\lambda = 70$ nm

Figura 27. Espectro de fluorescência sincronizada BFA e BFS em $\Delta\lambda = 75$ nm

Figura 28. Espectro de fluorescência sincronizada BFA e BFS em $\Delta\lambda = 80$ nm

Figura 29. Espectro de fluorescência sincronizada BFA e BFS em $\Delta\lambda = 85$ nm

Figura 30. Espectro de fluorescência sincronizada BFA e BFS em $\Delta\lambda = 90$ nm

Figura 31. Espectro de fluorescência sincronizada BFA e BFS em $\Delta\lambda = 95$ nm

Pela análise das Figuras 13 a 31, a melhor resolução dos espectros foi observada com um $\Delta\lambda = 85$ nm (Figura 29), com um máximo de excitação em 227,5 nm para o BFA e 270 nm para o BFS. Esta condição oferece uma melhor separação e simplificação dos espectros e uma intensidade máxima do sinal do BFA, assumindo que o nível de ruído seja constante ao longo da banda, a intensidade máxima terá a melhor razão sinal/ruído (S/R). Além disso, com esse valor de $\Delta\lambda$ a intensidade do sinal do BFS é minimizada. Neste sentido, para determinação do BFA por fluorescência sincronizada foram adotados os seguintes parâmetros: $\Delta\lambda = 85$ nm, com um máximo de excitação em 227,5 nm; velocidade de escaneamento (*scan rate*) de 1500 nm/min; fenda de excitação (*excitation slits*) de 5,0 nm; fenda de emissão

(*emission slits*) de 5,0 nm; faixa de varredura (*range*) de 200 a 400 nm.

6.3. Parâmetros de validação

6.3.1. Linearidade

A linearidade é descrita pela equação de regressão linear $y = ax + b$, onde **a** é a inclinação da reta e **b** a intersecção da curva no eixo y. A ANVISA recomenda que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes em triplicata. Para que um método seja considerado linear ele deve apresentar um coeficiente de correlação (*r*) superior a 0,99 (ANVISA, 2003).

A linearidade foi determinada através da construção de três curvas de calibração na faixa de 25 a 450 $\mu\text{g.L}^{-1}$, que indicam o intervalo de linearidade do método para determinação do BFA. A Figuras 32 representa as três curvas analíticas para o BFA, preparadas em diferentes dias. As curvas foram obtidas como preconizado pela ANVISA. As três curvas se mostraram lineares no intervalo de concentração de 25 a 450 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Pode ser observado pelo gráfico a similaridade entre as três curvas analíticas.

Figura 32. Curvas de linearidade do BFA em diferentes dias.

Os parâmetros referentes à linearidade do método foram obtidos através de uma curva média, e estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Dados referentes à linearidade do método.

Parâmetros	Resultados
Faixa de linearidade	25 – 450 $\mu\text{g.L}^{-1}$
Equação: $y = ax + b$	$y = 2,0849x + 16,5617$
Inclinação da reta (a) $\pm$ desvio padrão	$2,0849 \pm 0,0575$
Intersecção no eixo y (b) $\pm$ desvio padrão	$16,5617 \pm 3,0879$
Coeficiente de correlação (r)	0,9993

6.3.2. Resíduos

Um alto coeficiente de correlação é necessário, mas não suficiente para garantir a boa qualidade do modelo. Os resíduos (e_i) também devem ser analisados, os quais são definidos como a diferença entre um valor observado (y_i) e seu valor estimado ($\hat{y}_i$), ou seja, um resíduo padronizado é igual ao valor de um resíduo, dividido por uma estimativa de seu desvio padrão. Uma curva bem ajustada deve apresentar um gráfico de resíduos *versus* valor estimado com distribuição normal e média igual a zero. Gráficos com esse perfil indicam que os resíduos possuem comportamento aleatório e que sua variância é constante no domínio da concentração, ou seja, os dados são homocedásticos.

Os valores dos resíduos e dos resíduos padronizados das três curvas analíticas estão apresentados na Tabela 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2. Valores dos resíduos das curvas de calibração obtidas para validação da metodologia.

Resíduos Curva de Calibração			
	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Resíduos	2,1	0,5	1,9
	- 0,4	- 0,6	- 2,7
	- 7,7	- 5,6	- 1,6
	12,9	13,1	5,7
	- 7,0	- 7,5	3,2
Média	0,0	0,0	0,0
Desvio Padrão	8,38	8,04	3,76

Tabela 3. Valores dos resíduos padronizados das curvas de calibração obtidas para validação da metodologia.

Resíduos Padronizados Curva de Calibração			
	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Resíduos	0,26	0,06	0,50
	- 0,04	- 0,07	- 0,71
	- 0,92	- 0,70	- 0,44
	1,54	1,63	1,52
	- 0,83	- 0,93	- 0,86

As Figuras 33, 34 e 35 mostram os gráficos de resíduos padronizados obtidos das três curvas analíticas.

Figura 33. Gráfico de resíduos padronizados obtidos da curva analítica do 1º Dia.

Figura 34. Gráfico de resíduos padronizados obtidos da curva analítica do 2º Dia.

Figura 35. Gráfico de resíduos padronizados obtidos da curva analítica do 3º Dia.

Os resíduos também foram analisados com o objetivo de confirmar se seguem uma distribuição normal com média zero. O teste de Andreson-Darling, que mede o quão bem os dados seguem uma distribuição em particular, por exemplo, pode ser utilizado para determinar se os dados atendem à suposição de normalidade para um teste t, foi utilizado para testar a normalidade dos resíduos, utilizando o *Minitab 17 Statistical Software* (Copyright 2007 Minitab Inc). Os resultados do teste de Anderson-Darling para os resíduos das três curvas analíticas são mostrados na Figuras 36, 37 e 38 em gráficos de probabilidade normal de resíduos.

Figura 36. Gráfico de probabilidade normal de resíduos 1º Dia.

Figura 37. Gráfico de probabilidade normal de resíduos 2º Dia

Figura 38. Gráfico de probabilidade normal de resíduos 3º Dia

Pelo teste de Anderson-Darling foi possível obter os valores de p para os dados da distribuição, com valores de 0,761; 0,555 e 0,731 para o 1º, 2º e 3º dia, respectivamente. Para um valor de p maior que o nível de significância ($\alpha = 0,05$) não se rejeita a hipótese nula, que para o teste de Anderson-Darling a hipótese nula é que os dados seguem uma distribuição normal.

Pela análise dos resíduos, os modelos matemáticos das três curvas analíticas obtidas obedecem aos pressupostos exigentes ao fazer a regressão pelo Método dos Quadrados Mínimos, no qual assume-se que os resíduos são independentes, apresentam uma distribuição normal com média zero e igual variância (FERREIRA, 2015; PAGANO et al, 2004).

6.3.3. Limite de detecção e quantificação

A sensibilidade do método foi avaliada por meio da determinação dos limites de detecção e quantificação realizados através da análise de dez replicatas do branco em três curvas de calibração obtidas em dias diferentes. O limite de detecção (LD) e

o limite de quantificação (LQ) foram determinados segundo as equações:

$$LD = 3 \times \frac{s}{S}$$

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S}$$

Onde s é a estimativa do desvio padrão do branco e S é a inclinação (“*slope*”) ou coeficiente angular da curva analítica

A Tabela 4 mostra os valores de limite de detecção e quantificação para o BFA. Foram realizadas 30 medidas do branco (metanol) em três diferentes dias.

Tabela 4. Valores dos limites de detecção e quantificação do BFA.

Concentração de BFA em $\mu\text{g.L}^{-1}$	
Limite de detecção (n=30)	$1,20 \pm 0,68$
Limite de quantificação (n=30)	$3,99 \pm 2,26$

6.3.4. Precisão

A precisão do método foi considerada em dois níveis, a repetibilidade (precisão intra-corrida) e a precisão intermediária (precisão inter-corrida). A Repetibilidade do método foi verificada por determinações contemplando o intervalo linear do método, ou seja, três concentrações, 25, 250 e 450 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (baixa, média e alta), com 9 replicatas cada. A repetibilidade foi expressa como estimativa do desvio padrão relativo (RSD), também conhecido com coeficiente de variação (CV).

$$\text{RSD (\%)} \text{ ou } \text{CV (\%)} = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

s é o desvio padrão absoluto; $\bar{x}$ é a média aritmética das medições

A precisão intermediária do método também foi verificada por determinações contemplando o intervalo linear do método, ou seja, três concentrações, 25, 250 e 450

$\mu\text{g.L}^{-1}$ (baixa, média e alta), com 9 replicatas cada. A determinação da precisão intermediária foi realizada com um prazo de dois dias entre as análises e também foi expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD).

A Tabela 5 e 6 apresenta os valores de precisão inter-corridas e intra-corrida para o BFA.

Tabela 5. Valores de precisão inter-corridas para o BFA. (valores médios, n=9).

Precisão Inter-corridas BFA			
Concentração de BFA	25 $\mu\text{g.L}^{-1}$	250 $\mu\text{g.L}^{-1}$	450 $\mu\text{g.L}^{-1}$
Dia 1 (n=9)	3,92%	1,04%	0,98%
Dia 2 (n=9)	3,20%	1,32%	1,71%
Dia 3 (n=9)	3,54%	1,19%	0,29%

Tabela 6. Valores de precisão intra-corridas para o BFA (valores médios, n=9).

Precisão Intra-corridas BFA			
Concentração de BFA	25 $\mu\text{g.L}^{-1}$	250 $\mu\text{g.L}^{-1}$	450 $\mu\text{g.L}^{-1}$
	8,54%	7,62%	3,21%

6.3.5. Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através de ensaios de recuperação, por determinações contemplando o intervalo linear do método, ou seja, três concentrações de BFA, 25, 250 e 450 $\mu\text{g.L}^{-1}$. (baixa, média e alta), com 9 replicatas cada. A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a teórica correspondente:

$$Exatidão = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

O intervalo de recuperação (exatidão) aceitável é função da concentração e da finalidade da análise. Para a *Association of Analytical Communities* (AOAC), concentrações na ordem de $\mu\text{g.L}^{-1}$ tem um intervalo aceitável de exatidão entre 70 e 125%, podendo esses valores serem modificados, dependendo do tipo e finalidade do ensaio.

A Tabela 7 mostra os valores de exatidão para o BFA.

Tabela 7. Valores de exatidão para o BFA. (valores médios, n=9).

Concentração de BFA	Exatidão BFA		
	25 $\mu\text{g.L}^{-1}$	250 $\mu\text{g.L}^{-1}$	450 $\mu\text{g.L}^{-1}$
Dia 1 (n=9)	87,4%	111%	101%
Dia 2 (n=9)	99,8%	92,4%	98,0%
Dia 3 (n=9)	104%	101%	101%

6.3.6. Recuperação

A recuperação de um método analítico é melhor estabelecida pela comparação da resposta de uma amostra extraída, em concentrações baixas, médias e altas, com outras amostras não extraídas.

A recuperação do BFA foi analisada utilizando um padrão puro de BFA (BFA não extraído), nas concentrações de 25, 250 e 45 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (concentrações baixa, média e alta) comparado com as soluções obtidas nas mesmas concentrações (25, 250 e 45 $\mu\text{g.L}^{-1}$) após a adição do BFA em um papel livre de BFA (papel previamente extraído) e submetido ao processo de extração (BFA extraído).

As Tabelas 8 e 9 apresentam os valores de recuperação, DP e desvio padrão relativo para o BFA padrão e BFA extraído, respectivamente.

Tabela 8. Valores de Recuperação, DP e DPR para o BFA não extraído (n=9).

BFA não Extraído			
Concentração de BFA	Recuperação (%)	Desvio Padrão (DP)	Desvio Padrão Relativo (DPR)
25 µg.L ⁻¹ (n=9)	104	2,38	3,58
250 µg.L ⁻¹ (n=9)	100	3,78	0,72
450 µg.L ⁻¹ (n=9)	101	8,15	0,87

Tabela 9. Valores de recuperação, DP e DPR para o BFA extraído (n=9).

BFA Extraído			
Concentração de BFA	Recuperação (%)	Desvio Padrão (DP)	Desvio Padrão Relativo (DPR)
25 µg.L ⁻¹ (n=9)	100	0,86	1,33
250 µg.L ⁻¹ (n=9)	102	7,95	1,49
450 µg.L ⁻¹ (n=9)	102	8,16	0,86

Como observado na Tabelas 8 e 9 os valores de recuperação do procedimento de extração estão próximos a 100% (valor desejável), para todas as concentrações testadas (25, 250 e 450 µg.L⁻¹) o que indica a eficiência de extração do método.

6.3.7. Avaliação da eficiência do método de extração

Para analisar a eficiência do método de extração de BFA, três amostras foram randomicamente selecionadas e extraídas com 5 mL de metanol (com agitação e ultrassom). Após cada ciclo de extração amostras foram diluídas e foi determinada a concentração do BFA no solvente. As Figuras 39, 40 e 41 apresentam a concentração de BFA determinada após cada um dos quatro processos de extração de três amostras selecionadas randomicamente

Figura 39. Concentração de BFA da amostra 1 após cada ciclo de extração.

Figura 40. Concentração de BFA da amostra 2 após cada ciclo de extração.

Figura 41. Concentração de BFA da amostra 3 após cada ciclo de extração

Como observado pelas Figuras 39, 40 e 41 a concentração de BFA obtida após o primeiro ciclo de extração é muito superior aos demais ciclos de extração (duas ordens de grandeza superior a 2ª extração e três ordens superiores as demais extrações) justificando a realização de apenas uma etapa da extração. Considerando o valor da primeira extração de BFA como sendo 100%, as demais extrações (segunda, terceira e quarta extração) das três amostras de papel representam valores de extração inferiores a 1,0; 0,1; 0,1% respectivamente em relação a primeira quantidade de BFA extraído.

A concentração de BFA em diferentes partes do mesmo papel também foi avaliada. Cinco papéis termossensíveis foram randomicamente selecionados e cinco círculos com 12 mm de diâmetros cada foram obtidos de cada papel: canto superior esquerdo (CSE), canto superior direito (CSD), centro (C), canto inferior esquerdo (CIE) e canto inferior direito (CID). Não houve diferença estatística na concentração de BFA nas diferentes regiões do papel (ANOVA com um 1 fator, com 95% de confiança).

6.3.8. Seletividade

A seletividade do método foi avaliada comparando duas curvas analíticas, uma na presença da matriz e a outra sem a presença da matriz. Foram obtidas duas curvas analíticas muito semelhantes, ou seja, apresentaram praticamente o mesmo coeficiente angular (α). Na curva extraída o coeficiente angular foi de 2,1064 enquanto na curva seca foi de 2,1079. Pode-se considerar que não há interferência da matriz na determinação da substância de interesse. A Figura 42 mostra as curvas analíticas com e sem a presença da matriz

Figura 42. Curvas analítica na presença da matriz e sem a presença da matriz.

A seletividade também foi avaliada pela presença de BFS que, por possuir propriedades similares e ser uma alternativa ao BFA pode estar, porventura, presente.

As Figuras 43 e 44 apresentam uma comparação das intensidades do sinal analítico para BFA (puro), BFS (puro) e uma mistura sintética (BFA + BFS) em diferentes concentrações.

Figura 43. Intensidade do sinal analítico BFA, BFS e BFA+BFS (0,01 a 1,0 mg.L⁻¹)

Figura 44. Intensidade do sinal analítico BFA, BFS e BFA+BFS (1,0 a 100 mg.L⁻¹)

Pela análise das figuras acima pode-se considerar que a intensidade do sinal do BFA não sofre interferência do BFS, quando o BFS está presente numa mistura sintética de BFA mais BFS numa concentração de 0,1 mg.L⁻¹ de BFA e até 1,0 mg.L⁻¹ de BFS. Cabe ainda ressaltar que utilizando outras soluções de misturas de BFA e BFS verificou-se ser possível a quantificação do BFA na presença de concentrações

de BFS sempre com concentrações até dez vezes maiores que sua concentração. Em concentrações de BFS superiores a 10 vezes a concentração do BFA (1,0 a 100 mg.L⁻¹ de BFS) aparentemente ocorre uma diminuição da intensidade do sinal do BFA, indicando uma possível interação, que resulta na diminuição da intensidade da fluorescência, ou seja, não sendo possível a quantificação do BFA nessas condições.

As concentrações de BFA obtidas através da técnica de fluorescência sincronizada em várias amostras foram comparadas com os resultados obtidos por outra técnica analítica, a LC-MS/MS, para aprofundar os estudos de validação do método proposto. Sendo assim, vinte amostras de papéis termossensíveis foram randomicamente selecionadas para comparação entre as técnicas. Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre as concentrações obtidas pelas duas metodologias (teste *t* pareado, com 95% de confiança) indicando que a fluorescência sincronizada pode ser uma alternativa simples e eficaz na determinação de BFA em amostras de papéis.

6.4. Avaliação das concentrações de BFA em papéis termossensíveis

O método desenvolvido e validado foi então aplicado na análise de 341 papéis termossensíveis, sendo o BFA detectado em 98% das amostras analisadas, com concentrações variando desde menores que o LD até 27,7 mg.g⁻¹ com uma média geométrica de 14,6 mg.g⁻¹ e uma mediana de 17,7 mg.g⁻¹ (Tabela 10). Dentre as 341 amostras analisadas, em somente 7 amostras (2%) o BFA não foi detectado, o que pode sugerir a existência de alternativas, dentre elas possivelmente o BFS (resultado posteriormente confirmado nos estudos por LC-MS/MS), que vem sendo utilizado como revelador em alguns tipos de papéis termossensíveis (LIAO et al, 2012). Concentrações elevadas de BFA foram detectadas (Tabela 10) em todos os tipos de papéis termossensíveis analisados (cupom fiscal, extrato bancário, comprovante de pedágio e comprovante de cartão de crédito), sugerindo que a população geral e exposta tais como, caixas e bancários, possam estar expostos ao BFA.

A Tabela 11 compara as concentrações de BFA obtidos encontradas neste estudo com outros estudos desenvolvidos em diferentes países (Tabela 11). A taxa de positividade em outros países variou de 44 a 100%, apresentando valores abaixo do limite de detecção do método até 4,3% (mg BFA/100 mg de papel). Em contraste, as amostras do Japão apresentaram níveis não detectáveis de BFA (LIAO and

KANNAN, 2011). Esses resultados foram atribuídos à eliminação progressiva do BFA em papéis termossensíveis no Japão desde 2001. Além disso, Liao et al. (2012) observaram uma significativa correlação negativa entre os níveis de BFA e BFS nas amostras, onde os recibos termossensíveis com altas concentrações de BFS continham baixas concentrações ou concentrações não detectáveis de BFA e vice-versa, o que sugere a substituição do BFA pelo BFS.

Neste estudo, o BFA foi detectado em 98% das amostras de papéis termossensíveis analisadas, com concentrações inferiores ao LD até 2,78 %. Estudos prévios realizados em nosso grupo de pesquisa (ROCHA et al., 2015) porém, utilizando a técnica de LC-MS/MS como ferramenta de análise, encontraram concentrações mais elevadas de BFA em outras amostras analisadas, que foram desde de abaixo do limite de detecção até 4,3%. Entretanto, tanto a média geométrica quanto a mediana (1,6%) do estudo de Rocha et al, 2005 são similares as encontradas neste estudo (1,5 e 1,8 %, respectivamente). Cabe destacar que as concentrações de BFA observadas neste estudo foram superiores as concentrações encontradas em outros países (Tabela 11).

Tabela 10. Concentração de BFA (mg/g) em 341 papéis termossensíveis obtidos no Brasil, classificados de acordo com a localização onde os papéis foram obtidos.

Papel Termossensível	Localização	n	MG*	Mediana	Faixa de Concentração (mg/g)	Taxa de Detecção
Cupom Fiscal	Bilhete de Avião	6	19,1	18,5	16,5-22,2	100%
Cupom Fiscal	Bilhete de Ônibus	6	3,26	21,3	0,033-24,2	100%
Cupom Fiscal	Cinema	6	19,8	20,3	17,5-22,3	100%
Cupom Fiscal	Doceria	6	4,52	13,0	0,112-26,7	100%

(Continua)

(Continuação)

Papel Termossensível	Localização	n	MG*	Mediana	Faixa de Concentração (mg/g)	Taxa de Detecção
Cupom Fiscal	Farmácia	22	10,5	19,5	0,029-23,0	100%
Cupom Fiscal	Livraria	7	19,5	21,8	13,0-25,5	100%
Cupom Fiscal	Loja de Roupas	10	21,0	20,0	13,7-26,1	90%
Cupom Fiscal	Perfumaria	6	2,99	17,2	0,054-24,2	100%
Cupom Fiscal	Posto de Combustível	15	11,9	19,1	0,567-27,0	93,3%
Cupom Fiscal	Restaurante	30	12,8	18,5	0,880-25,0	100%
Cupom Fiscal	Supermercado	33	16,7	19,0	<LD-25,6	90,9%
Cupom Fiscal	Outros	14	18,0	20,0	10,7-22,3	85%
Extrato Bancário	Banco	11	17,8	18,4	13,7-22,8	100%
Comprovante de Pedágio	Pedágio	10	17,4	16,8	14,3-27,8	100%
Comprovante de cartão de credito	Bar	20	16,6	16,6	13,2-21,9	100%
Comprovante de cartão de credito	<i>Fast-Food</i>	30	17,4	17,3	13,9-23,4	100%
Comprovante de cartão de credito	Farmácia	15	17,4	17,6	10,2-24,4	100%

(Conclusão)						
Papel Termossensível	Localização	n	MG*	Mediana	Faixa de Concentração (mg/g)	Taxa de Detecção
Comprovante de cartão de credito	Loja de Roupas	15	16,4	16,9	11,4-23,0	100%
Comprovante de cartão de credito	Loja de Suplementos	5	16,3	17,7	8,78-21,1	100%
Comprovante de cartão de credito	Posto de Combustível	9	15,3	15,4	11,1-19,0	100%
Comprovante de cartão de credito	Restaurante	26	15,0	15,2	11,3-19,8	100%
Comprovante de cartão de credito	Supermercado	12	19,5	19,3	14,7- 24,2	100%
Comprovante de cartão de credito	Outros	13	14,3	14,0	8,95-18,3	100%
Todos Papéis Termossensíveis	-	341	14,6	17,7	<LD-27,8	98,0%

*MG = média geométrica

Tabela 11. Concentrações de BFA em papéis termossensíveis determinadas em amostras de diferentes países.

País	n	Taxa de Detecção	%	Referência
Brasil	341	98%	<LD – 2,8	Este estudo
Brasil	190	98%	<LD – 4.3*	Rocha et al. (2015)
Bélgica	44	98%	<1.10 ⁻⁶ – 2.1	Geens et al. (2012)
China	42	100%	0.3 – 1.5	Lu et al. (2013)
Coréia	11	100%	2.10 ⁻³ – 1.0	Liao et al. (2011a)
Dinamarca	12	65%	< LD – 1.7	Lassen et a. (2011)
Estados Unidos	83	100%	5.10 ⁻⁴ – 1.4	Liao et al. (2011a)
Estados Unidos	36	44%	0.8 – 2.8	Environmental Working Group (2010)
Estados Unidos	10	80%	0.09 – 1.7	Mendum et al. (2011)
Itália	50	88%	<LD – 1.5	Russo et al. (2017)
Japão	6	0%	<LD	Liao et al. (2011a)

(Continua)

(Conclusão)				
País	n	Taxa de Detecção	%	Referência
Suécia	16	100%	0.6 – 2.3	Östberg et al. (2010)
Suíça	13	85%	$<5.10^{-5}$ - 1.7	Biedermann et al. (2010)
Vietnam	3	100%	0.6 – 0.7	Liao et al. (2011a)

* Concentração de BFA ou BFS

6.5. Avaliação da concentração de BFA em outros tipos de papéis

Como citado anteriormente o BFA presente nos papéis termossensíveis não está quimicamente ligado, ou seja, ele se apresenta na forma de um monômero livre, podendo ser facilmente transferido dos papéis termossensíveis para outros objetos em contato com este, incluindo vários tipos de papéis utilizados em embalagens de alimentos. Além disso, o processo de reciclagem dos papéis termossensíveis pode ser considerado uma potencial fonte de contaminação do BFA para os papéis e produtos de papel recicláveis, uma vez que cerca de 30% do papel termossensível produzido no mundo entra no processo de reciclagem (EUROPEAN COMMISSION, 2010). Os papéis reciclados são usados na produção de uma ampla variedade de produtos de papel como papel higiênico, papel toalha, jornal, revistas entre outros (LIAO et al. 2011). O processo de reciclagem dos papéis termossensíveis juntamente com outros tipos de papel, pode aumentar o risco de exposição humana ao BFA via contaminação cruzada. Neste estudo, 103 amostras de 12 diferentes tipos de papel foram analisadas e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Concentração de BFA ($\mu\text{g.g}^{-1}$) em 103 amostras de diferentes tipos de papéis e produtos de papel.

Tipo de Papel	n	MG*	Mediana	Faixa de Concentração $\mu\text{g.g}^{-1}$	Taxa de Detecção
Bilhete de loteria	7	16,5	15,9	11,6-26,4	100%
Bilhete de Ônibus	5	1,85	2,88	< LD-5,56	80%
Cartão de Visita	12	21,1	22,17	7,67-57,0	100%
Envelope	11	17,6	16,9	9,42-55,5	100%
<i>Flyer</i>	10	38,1	36,0	10,6-110	100%
Guardanapo	8	14,0	15,3	6,11-21,2	100%
Jornal	6	26,7	44,5	1,15-379	100%
Papel de impressão	3	18,7	17,6	14,7-25,0	100%
Embalagem de alimento	20	12,2	17,3	2,14-56,1	100%
Papel Higiênico	8	15,5	16,8	7,16-31,0	100%
Papel Toalha	4	28,4	31,0	15,0-54,0	100%
Revista	9	2,99	7,79	<LD - 18,7	77%
Todos os papéis	103	14,7	17,3	<LD-379	96%

*MG: média geométrica

Poucos estudos têm reportado a ocorrência de BFA em papéis e produtos de papel que não sejam aqueles relacionados com os papéis térmicos (VINGGAAR et al., 2000; GEHRING et al., 2004; OZAKI et al., 2004; LIAO et al., 2011). Vinggaard e colaboradores (2000) coletaram 20 amostras de papel toalha, 9 das quais eram produzidas a partir de papel reciclado e o restante de papel “virgem”, obtidas de lojas

na Dinamarca. BFA foi detectado em concentrações de 0,6 à 24,1 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (MG: 3,9 $\mu\text{g.g}^{-1}$) em papéis reciclados, e concentrações abaixo de 0,04 $\mu\text{g.g}^{-1}$ em papéis virgem, com exceção de uma das amostras, que continha uma concentração de 0,1 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de BFA, confirmando que o papel reciclado é o responsável pela contaminação. As concentrações de BFA encontradas na Dinamarca foram menores, porém da mesma ordem de grandeza ($\mu\text{g.g}^{-1}$) que as encontradas nesse estudo (15,0 a 54,0 $\mu\text{g.g}^{-1}$; MG: 28,4 $\mu\text{g.g}^{-1}$).

Gehring e colaboradores (2004) analisaram 3 tipos de papel higiênico feitos a partir de papel 100% reciclado, e papel descartado (incluindo flyers, revistas e jornais) obtidos de supermercados na Alemanha. O BFA foi encontrado em todas as amostras de papel, com concentrações de 3,2 à 46,1 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (MG: 18,9 $\mu\text{g.g}^{-1}$) para as amostras de papel higiênico e concentrações de 0,09 à 5,1 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (MG: 1,24 $\mu\text{g.g}^{-1}$) para os outros tipos de papéis. As concentrações de BFA encontradas em papéis higiênico, nesse estudo (7,16 a 31,0 $\mu\text{g.g}^{-1}$; MG: 15,5 $\mu\text{g.g}^{-1}$, com uma taxa de detecção de 100%) são similares às obtidas por Gehring e colaboradores, para os papéis descartados, que incluem flyers, revistas e jornais as concentrações encontradas (<LQ a 379 $\mu\text{g.g}^{-1}$; MG: 16,0 $\mu\text{g.g}^{-1}$) com uma taxa de detecção de 91%) foram superiores, porém na mesma ordem de grandeza ($\mu\text{g.g}^{-1}$).

Ozaki e colaboradores (2004) analisaram 28 amostras de papel e papel cartão utilizados como embalagens para alimentos dos quais, 12 eram feitos a partir de material reciclado e os demais de papel virgem. Todos os produtos foram coletados em supermercados no Japão. BFA foi detectado em 67% das amostras analisadas (0,19 – 26,0 $\mu\text{g.g}^{-1}$), com concentrações < LQ – 26,0 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (MG: 0,255 $\mu\text{g.g}^{-1}$) para amostras de papel reciclado e concentrações < LQ – 0,36 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (MG: 0,044 $\mu\text{g.g}^{-1}$) em amostras de papel virgem. As concentrações de BFA encontradas no Brasil (presente estudo) em amostras de papel em contato com alimento foram de 2,14 a 56,1 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (MG: 12,252 $\mu\text{g.g}^{-1}$) e estão próximas a aquelas descritas por Ozaki e colaboradores para amostras do Japão, na mesma ordem de grandeza ($\mu\text{g.g}^{-1}$).

Liao e kannan (2011) determinaram a concentração de BFA em 202 amostras de 15 tipos de papel (papel termossensível, *flyers*, revistas, tíquete, envelopes, jornais, papéis em contato com alimento, caixas (embalagens) para alimento, passagem de avião, etiquetas de bagagem, papel de impressão, cartão de visita, guardanapo, papel

toalha e papel higiênico) coletados em diferentes cidades dos Estados Unidos. Entre os produtos de papel (excluindo os papéis termossensíveis (n=103), cuja taxa de detecção foi de 94%), 81% das amostras (n=99) continham BFA em concentrações entre < LQ a 14,4 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (MG: 0,016 $\mu\text{g.g}^{-1}$) conforme pode ser observado pela Tabela 13.

Tabela 13. Concentração de BFA ($\mu\text{g.g}^{-1}$) em 99 amostras de papel nos Estados Unidos (adaptado de LIAO et al., 2011).

Tipo de Papel	n	MG*	Mediana	Faixa de Concentração	Taxa de Detecção
<i>Flyer</i>	24	0,023	0,022	<LQ-0,60	88%
Revista	5	0,019	0,017	0,008-0,055	100%
Tíquete	4	0,676	0,388	0,118-14,4	100%
Envelope	5	0,001	0,0007	<LQ-0,016	40%
Jornal	8	0,151	0,277	0,031-0,658	100%
Embalagem de alimento	12	0,004	0,001	<LQ-0,264	50%
Caixas (embalagem) para alimento	7	0,013	0,047	<LQ-0,055	71%
Passagem de avião	4	0,051	0,045	0,012-0,415	100%
Etiqueta de bagagem	4	0,003	0,007		25%
Papel de impressão	3	0,020	0,020	0,002-0,021	100%
Cartão de visita	6	0,024	0,028	0,007-0,10	100%
Guardanapo	8	0,011	0,003	<LQ-3,340	88%
Papel toalha	3	0,001	0,002	<LQ-0,002	67%
Papel higiênico	6	0,009	0,003	0,002-0,180	100%

*MG: média geométrica

Comparando as concentrações de BFA em produtos de papel do Brasil (neste estudo, Tabela 12) com as concentrações obtidas em amostras de papel nos Estados Unidos (Tabela 13), a concentração BFA de todas as amostras no Brasil (n=103) de diferentes tipos de papel (12 diferentes tipos de papéis) foram superiores, <LQ – 379 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (14,7 $\mu\text{g.g}^{-1}$).

Uma das possíveis causas de se encontrar altas concentrações de BFA nos papéis, pode estar relacionado a uma falta de fiscalização e legislação vigente, uma vez que, o BFA, no Brasil, é proibido somente para fabricação e importação de mamadeiras (RDC n.41/2011), e permitido em embalagens em contato com alimentos até certa concentração (limite de migração específico 0,6 mg.kg^{-1} , ANVISA, RDC n.17/2008). Já para as demais aplicações do BFA, ainda não existe nenhuma restrição. Considerando as concentrações e a taxa de detecção do BFA encontradas nas amostras de papel analisadas, a exposição humana ao BFA através de produtos de papel é ubíqua, uma vez que esses papéis são utilizados diariamente.

6.6. Exposição humana ao BFA via manipulação de papéis.

Ao contrário de muitas outras aplicações, o BFA, nos papéis termossensíveis, está presente na forma de monômero livre, sem ligações químicas, podendo ser transferido pelo simples contato físico, o que aumenta o risco de absorção dérmica (LU et al., 2013). Considerando as altas concentrações de BFA em papéis termossensíveis e seu alto coeficiente de absorção dérmica (BIEDERMANN et al, 2010), a manipulação de produtos de papel (principalmente os papéis termossensíveis) pode ser uma importante fonte de exposição humana, principalmente para pessoas ocupacionalmente expostas tais como, pessoas que manipulam dinheiro e recibos em lojas, bancos entre outros (LIAO et al., 2011; GEENS et al., 2012; LU et al., 2013).

Neste estudo, a estimativa da exposição humana ao BFA através da manipulação de diferentes tipos de papéis foi calculada baseada na medida da concentração do BFA nos papéis e a frequência de manipulação dos mesmos. A frequência e o tempo de manipulação são provavelmente diferentes para os diferentes tipos de papéis. Alguns tipos de papéis, incluindo revista, jornais, guardanapos, papel

toalha e papel higiênico, podem ser mais frequentemente manipulados. Foi assumido que estes 5 tipos de papéis são manipulados 10 vezes por dia, enquanto os demais tipos de papéis, 5 vezes por dia, tanto para a exposição ocupacional quanto para a manipulação não ocupacional. Para os papéis termossensíveis a diferença entre a exposição ocupacional em relação a manipulação não ocupacional está relacionada com a frequência de manipulação, foi adotado que a população geral manipula esse tipo de papel 2 vezes por dia, enquanto que indivíduos expostos ocupacionalmente manipulam os papéis termossensíveis 150 vezes por dia (LIAO et al., 2011).

A exposição da população brasileira ao BFA via manipulação de papéis foi calculada de acordo com Liao e colaboradores (LIAO and KANNAN, 2011). Poucas informações sobre a taxa de transferência do BFA através da manipulação desses tipos papéis encontram-se disponível na literatura e no Brasil essa informação é inexistente. Portanto, para o cálculo da ingestão diária aceitável (IDA) foram utilizados valores encontrados por outros autores (BIEDERMANN et al, 2010; LIAO et al., 2011a; LIAO et al., 2012). A IDA (ng/dia) de BFA foi calculada usando a equação abaixo:

$$IDA = \frac{K \times C \times HF \times HT \times AF}{10^6}$$

Onde: K é o coeficiente de transferência de BFA papel/pele (calculado por BIEDERMANN et al., 2010; como 21522,4 ng/s); C é a concentração de BFA em amostras de papéis ($\mu\text{g.g}^{-1}$); HF é a frequência de manipulação do papel (vezes/dia), HT é o tempo de manipulação (5 s para cada manipulação); AF é a fração de absorção de BFA pela pele (27%, LIAO et al., 2011a).

Os resultados de IDA obtidos para a população geral e exposição ocupacional estão apresentados na Tabela 14. Para o cálculo da IDA ajustada pelo peso corporal, os valores encontrados foram divididos por um peso corporal médio da população brasileira de 72 Kg para homens adultos (acima de 20 anos) (IBGE, 2010), os valores obtidos estão apresentados na Tabela 15. Embora os valores de IDA calculados para o BFA em amostras de papéis, sejam várias ordens de grandeza menores que o valor de referência oral de 50000 ng/kg peso corporal/dia estabelecido pela USEPA, outras fontes de contaminação como água e alimentos, também devem ser consideradas. Além disso, alguns estudos sugerem que mesmo baixas doses de BFA (10 a 100

ng/kg peso corporal/dia) podem causar danos à saúde humana (CABATON, 2013; CARCHIA, 2015; VANDENBERG, 2015)

Tabela 14. Ingestão diária estimada (IDA; ng/dia) de BFA, via manipulação de papéis, pela população geral e indivíduos expostos ocupacionalmente.

Tipo de Papel	População geral		Exposição ocupacional	
	MG*	Mediana	MG	Mediana
Papel termossensível	850	1027	63.761	77054
Bilhete de loteria	0,959	0,925	0,959	0,925
Bilhete de Ônibus	0,108	0,167	0,108	0,167
Cartão de Visita	1,23	1,28	1,23	1,28
Envelopes	1,02	0,978	1,02	0,978
Flyer	2,22	2,09	2,22	2,09
Guardanapos	0,816	0,891	0,816	0,891
Jornal	1,55	2,59	1,55	2,59
Papel de impressão	1,08	1,03	1,08	1,03
Embalagem de alimento	0,712	1,00	0,712	1,00
Papel Higiênico	0,903	0,975	0,903	0,975
Papel Toalha	1,65	1,80	1,65	1,80
Revista	0,174	0,453	0,174	0,453
Exposição total (Σ EDI)	862	1041	63.773	77.068

*MG: média geométrica

Tabela 15. Ingestão diária estimada ajustada pelo peso corporal (72Kg) (ng/Kg peso corporal/dia) de BFA, via manipulação de papéis, pela população geral e indivíduos expostos ocupacionalmente.

Tipo de Papel	População geral		Exposição ocupacional	
	MG*	Mediana	MG	Mediana
Papel termossensível	11,8	14,3	885	1.070
Bilhete de loteria	0,013	0,013	0,013	0,013
Bilhete de onibus	0,001	0,002	0,001	0,002
Cartão de visita	0,017	0,018	0,017	0,018
Envelope	0,014	0,014	0,014	0,014
Flyer	0,031	0,029	0,031	0,029
Guardanapo	0,011	0,012	0,011	0,012
Jornal	0,022	0,036	0,022	0,036
Papel de impressão	0,015	0,014	0,015	0,014
Embalagem de alimento	0,010	0,014	0,010	0,014
Papel higiênico	0,013	0,014	0,013	0,014
Papel toalha	0,023	0,025	0,023	0,025
Revista	0,002	0,006	0,002	0,006
Exposição total (Σ EDI)	12,0	14,5	855	1.070

*MG: média geométrica

7. Conclusão

A metodologia proposta para determinação de BFA por fluorescência sincronizada é um método simples e rápido, que pode ser facilmente empregado em rotina como uma alternativa de baixo custo e de boa seletividade e sensibilidade para o monitoramento de BFA em papéis termossensíveis comercializados no Brasil. A aplicação da metodologia proposta na análise de diferentes tipos de papéis, de uso frequente no Brasil, mostrou elevadas concentrações deste composto nas amostras, da ordem de mg.g^{-1} .

Os valores estimados de ingestão diária aceitável (IDA) de BFA (considerando apenas o contato com papel) foram inferiores aos valores máximos preconizados pela *USEPA*. No entanto, deve-se ainda considerar outras potenciais fontes de exposição ao BFA, principalmente água e alimentos. Além disso, alguns estudos têm sugerido que mesmo baixas doses de BFA (inferiores aos valores preconizados pela *USEPA*) podem causar danos à saúde humana.

Finalmente, considerando que não existem restrições ao uso do BFA como revelador em papéis termossensíveis em nosso país, medidas neste sentido devem ser adotadas, uma vez que, pouco é conhecido sobre a magnitude da exposição ao BFA via manipulação de papéis e também os potenciais efeitos tóxicos desta substância ao longo do tempo.

8. Referências bibliográficas.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução-RE nº 899, **2003**.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução-RE nº 17, **2008**.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução-RE nº 41, **2011**.

AOAC (Association of analytical communities). Guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals, **2002**.

Based on Electrospun Nylon 6 Nanofibrous Membrane. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, **2010**, 38 (4), 503-507.

Berezin, M.Y.; Achilefu, S. Fluorescence lifetime measurements and biological imaging. *Chemical Reviews*, **2010**, 110 (5), 2641–2684.

Biedermann, S; Tschudin, P; Grob, K; Transfer of bisphenol A from thermal printer paper to the skin. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2010**, 398 (1), 571-576.

Björnsdotter, M.K., Boer, J., Ballesteros-Gomez, A. Bisphenol A and replacements in thermal paper: A review. *Chemosphere*, **2017**, 182, 691-706.

Bright, F.V. Bioanalytical applications of fluorescence spectroscopy. Department of Chemistry State University of New York at Buffalo Buffalo, NY, **1988**.

Cabaton, N.J., Canlet, C., Wadia, P.R., Tremblay-Franco, M., Gauiter, R., Molina, J., Sonnesnschein, C., Cravedi, J.P., Rubin, B.S., Soto, A.M., Zalko, D. Effects of Low Doses of Bisphenol A on the Metabolome of Perinatally Exposed CD-1 Mice. *Environmental Health Perspectives*, **2013**, 121(5), 586-593.

Carchia, E., Porreca, I., Almeida, P.J., D'Andelo, F., Cuomo, D., Ceccarelli, M., De Felice, M., Mallhardo, M., Ambrosino, C. Evaluation of low doses BPA- induced perturbation of glycemia by toxicogenomics points to a primary role of pancreatic islets and to the mechanism of toxicity. *Cell Death and Diseases*, 6, **2015**.

Chi, M.N., Wilhad, M. R., PerkinElmer, Inc USA. Analysis of bisphenol A in yoys by HPLC with fluorescence detections. Application Note. **2015**

Eiroa, A.A.; Huckins, S.R; Blanco, E.V.; Mahía, P.L.; Lorenzo, S.M.; Rodríguez, D.P. Optimizing resolution in constant-energy synchronous spectrofluorimetry. *Applied Spectroscopy*, **2000**, 54 (10), 1534-1538.

El-Enany, N.; Belal, F.; El-Shabrawy, Y.; Rizk, M. Second derivative synchronous fluorescence spectroscopy for the simultaneous determination of chlorzoxazone and ibuprofen in pharmaceutical preparations and biological fluids. *International Journal of Biomedical Science* **2009**; 5 (2), 136-145.

Eladak, S; Grisin, T; Moison, D; Guerquin, MJ; N'Tumba-Byn, T; Benachi, A; Livera, G; Rouiller-Fabre, V; Habert, R. A new chapter in the bisphenol A story: bisphenol S

and bisphenol F are not safe alternatives to this compound. *Fertility and Sterility*, **2015**, 103 (1), 11–21.

Elmansi, H.; Mohamed, A.A.; Fathy, M.E. Simultaneous determination of metoclopramide and aspirin by spectrofluorimetric technique: application to pharmaceutical formulations and human plasma. *Analytical. Methods*, **2016**, 8, 1281-1292.

Environmental Working Group. BPA in stores receipts, **2017**. Disponível em: <http://www.ewg.org/research/bpa-in-store-receipts>.

European Commission **2010** (EUR 24588 EN) european union risk assessment report. bisphenol A.

Ferreira, M.M.C. Quimiometria: conceitos, métodos e aplicações. Editora Unicamp, **2015**.

Föll, H. *Advanced Materials B*, part 1 – script, **2017**.

Food and Drug Administration (FDA). Guidance for industry update – process validation. January **2011**.

Forms of Luminescence. Articles on fluorescence topics of interest. Nightsea, Lexington, **2016**.

Geens T, Goeyens L, Kannan K, Neels H, Covaci A. Levels of Bisphenol-A in Thermal Paper Receipts from Belgium and Estimation of Human Exposure. *Science of the Total Environment*, **2012**, 30 (33), 435-436.

Gehring, M., Vogel, D., Tennhardt, L., Weltin, D., Bilitewski, B. Bisphenol A contamination of wastepaper, cellulose and recycled paper products. *Waste Management and the Environment II*, **2004**, 8, 293-300.

Guart, A; Bono-Blay, F; Borrell, A; Lacorte, S; Migration of plasticizers phthalates, bisphenol A and alkylphenols from plastic containers and evaluation of risk. *Food Additives & Contaminants: Part A*, **2011**, 28 (5), 676-685.

Hamamatsu. Photomultiplier tubes. basics and applications. Third Edition, **2007**.

Hammarling, L., Gustavsson, H., Svensson, K., Oskarsson, A. Migration of bisphenol-A diglycidyl ether (BADGE) and its reaction products in canned foods. *Food Additives and Contaminants*, **2000**, 17 (11), 937-43.

He, L.F.; Lin, D.L.; Li, Y.Q. Micelle-sensitized constant-energy synchronous fluorescence spectrometry for the simultaneous determination of pyrene, benzo[a]pyrene and perylene. *Analytical Science*, **2005**, 21, 641–645.

Hua, G.; Kilham, K.; Singleton, I. Potential application of synchronous fluorescence spectroscopy to determine benzo[a]pyrene in soil extracts. *Environmental Pollution*, **2006**, 139, 272–278.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), Pesquisa de orçamento familiar, 2008-2009, Antropometria e estado nutricional de crianças, jovens e adultos no Brasil, **2010**.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia e, Normalização e Qualidade Industrial). DOQ-CGCRE-008, Revisão 02 –**2007**.

ICH (International Conference on Harmonization). Good manufacturing practice guide for active pharmaceutical ingredients Q7, **2000**.

Jornal oficial da União Europeia, Regulamento (UE) N° 10/ 2011 da Comissão de 14 de Janeiro de 2011 relativo aos materiais e objetos de matéria plástica destinados a entrar em contacto com os alimentos, **2011**.

Kasha, M. Characterization of electronic transitions in complex molecules. *Discussions Faraday Society*, **1950**, 9, 14–19.

Kasha, M.; McGlynn, S.P. Molecular electronic spectroscopy. *Annual Review of Physical Chemistry* **1956**, 7, 403–424.

Lage-Yusty, M.A.; Lopez-Gonzalez, J.; Simal-Lozano, J. (Resolution of 13 polycyclic aromatic hydrocarbons by constant-wavelength synchronous spectrofluorometry. *Analytical Science*, **2005**, 21 (1), 203–1206.

Lakowicz, J.R. Principles of fluorescence spectroscopy third edition. University of Maryland school of medicine Baltimore, Maryland, USA, **2006**.

Lassen, C., Mikkelsen, S.H., Brandt, U.K. Migration of bisphenol A from cash register receipts and baby dummies. *Survey of Chemical Substances in Consumer Products*, **2011**, 110.

Lee, S; Liu, X; Takeda, S; Choi, K. Genotoxic potentials and related mechanisms of bisphenol A and other bisphenol compounds: A comparison study employing chicken DT40 cells. *Chemosphere*, **2013**, 93 (2), 434-440.

Li, Y.Q.; Li, X.Y.; Shindi, A.A.F.; Zou, Z.X.; Liu, Q.; Lin, L.R.; Li, N. Synchronous fluorescence spectroscopy and its applications in clinical analysis and food safety evaluation. *Reviews in Fluorescence* **2010**, Springer.

Li, Y.Q.; Sui, W.; Wu, C.; Yu, L.J. Derivative matrix isopotential synchronous fluorescence spectroscopy for the direct determination of 1-hydroxypyrene as a urinary biomarker of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Analytical Science*, **2001**, 17, 167–170.

Liao, C., Kannan, K., A survey of bisphenol A and other bisphenol analogues in foodstuffs from nine cities in China. *Food Additives & Contaminants Part A*, **2014**, 31 (2), 319-29.

Liao, C; Liu, F; kannan, K. Bisphenol S, a new bisphenol analogue, in paper products and currency bills and its association with bisphenol A residues. *Environmental. Science & Technology.*, **2012**, 46 (12), 6515–6522.

Liao, C; and Kannan, k; High levels of bisphenol A in paper currencies from several countries, and implications for dermal exposure. *Environmental Science & Technology*, **2011a**, 45, 6761-6768.

Liao, C., and K. Kannan. Widespread occurrence of bisphenol A in paper and paper products: Implications for human exposure. *Environmental Science & Technology*, **2011b**, 45, 9372–9379.

Liu, X.; Tao, S.; Deng, N.; Liu, Y.; Meng, B.; Xue, B.; Liu, G. Synchronous-scan fluorescence as a selective detection method for sodium dodecylbenzene-sulfonate and pyrene in environmental samples. *Analytica Chimica Acta*, **2006**, 572, 134–139.

Lu, S.Y., Chang, W.J., Sojinu, S.O., Ni, H.G. Bisphenol A in supermarket receipts and its exposure to human in Shenzhen, China. *Chemosphere*, **2013**, 92, 1190-1194.

Mendum, T., Stoler, E., VanBenschotenCt, H., Waner, J.C. Concentration of bisphenol A in thermal paper, *Green Chemistry Letters and Reviews*, **2011**, 4(1), 81-86.

Naresh, K. Applications of fluorescence spectroscopy. national level workshop on spectroscopic techniques in structural elucidation. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*, **2014**, 5, 18-21.

Nashua Corporation. “Label Products”, **2015**. Disponível em: <http://nashua.com/prodandservices/labelproducts.aspx?selected=labeltras>

Ni, Y.; Lin, D.; Kokot, S. Synchronous fluorescence and UV–vis spectroscopic studies of interactions between the tetracycline antibiotic, aluminium ions and DNA with the aid of the Methylene Blue dye probe. *Analytica Chimica Acta*, **2008**, 606, 19–25.

NIH, National Institute of Environmental Health Sciences, **2015**. Disponível em: <http://www.niehs.nih.gov/health/topics/agents/endocrine/>

Östberg T, Noaksson E. Bisfenol A in Svenska Kvitton. Analysresultat. Jämtlands läns Landsting, Institutet för Tillämoa Grön Kemi; **2010**.

Ozaki, A., Yamaguchi, Y., Fujita, T., Kuroda, K., Endo. Chemical analysis and genotoxicological safety assessment of paper and paperboard used for food packaging. *Food and Chemical Toxicology*, **2004**, 42, 1323–1337.

Pagano, M., Gauvreau, K. Princípios de bioestatística. Cengage Learning, **2004**.

Patra, D.; Barakat, C. Synchronous fluorescence spectroscopic study of solvatochromic curcumin dye. *Spectrochimica Acta Part A*, **2011**, 79 (5), 1034– 1041.

Patra, D., Mishra, A.K. Recent developments in multi-component synchronous fluorescence scan analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, **2002**, 21 (12), 787-798.

PerkinElmer Inc, An Introduction to Fluorescence Spectroscopy, **2000**.

Píš, L., Májek, P., Sádecká, J. Synchronous fluorescence spectroscopy for differentiating between brandies and wine distillates. *Acta Chimica Slovaca*, **2011**, 4 (1), 47 – 58.

Pulgarín, J.A.M.; Bermejo, L.F.G.; Rodríguez, S.B. Matrix isopotential synchronous fluorescence spectrometry for the determination of gibberellic acid in watermelon after ultraviolet-irradiation. *Royal Society of Chemistry Advances*, **2014**, 4, 5671-5677.

Pulgarín, J.A.M.; Molina, A.A.; Boras, N. Rapid determination of ciprofloxacin in urine by matrix isopotential synchronous spectrometry. *Analytical. Methods*, **2012**, 4, 3413-3419.

Ramkrishna, A. Application of fluorescence spectroscopy: excited state dynamics, food-safety, and disease diagnosis. Iowa State University, **2010**.

Rezg, R., El-Fazaa, S., Gharbi, N. Mornagui, B. Bisphenol A and human chronic diseases: Current evidences, possible mechanisms, and future perspectives. *Environment International*, **2014**, 64, 83-90.

Ribani, M., Bottoli, C.B.G., Collins, C.H., Jardim, I.C.S.F., Melo, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química. Nova*, **2004**, 27, 771-780.

Rocha, B.A., Azevedo, L.F., Gallimberti, M., Campiglia, A.D., Barbosa, F.J. High Levels of Bisphenol A and Bisphenol S in Brazilian Thermal Paper Receipts and Estimation of Daily Exposure. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, **2015**, 78 (18), 1181-1188.

Rochester, JR; Bisphenol A and human health: A review of the literature. *Reproductive Toxicology*, **2013**, 42, 132-155.

Russo, G., Barbato, F., Grumetto, L. Monitoring of bisphenol A and bisphenol S in thermal paper receipts from the Italian market and estimated transdermal human intake: A pilot study. *The Science fo Total Environment*, **2017**, 68 (75), 599-600.

Rykowska, I; Wasiak, W; Properties, Threats, and Methods of Analysis of Bisphenol A and its Derivatives. *Acta Chromatographica*, **2006**, 16, 7-27.

Ryder, A.G. Assessing the Maturity of Crude Petroleum Oils Using Total Synchronous Fluorescence Scan Spectra. *Journal of Fluorescence*, **2004**, 14, 99–104.

Silva CGA, Collins CH. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. *Química Nova*, **2011**, 34, 665-676.

Schechter, A; Malik, N; Haffner, D; Smith, S; Harris, R; Paepke, O; Birnbaum, L; Bisphenol A (BPA) in U.S. *Food. Environment. Science and. Technology*. **2010**, 44, 9425–9430.

Schreder, E. On the money: bpa on dollar bills and receipts. **2010**. Disponível em: <http://saferchemicals.org/2010/12/07/on-the-money-bpa-in-dollar-bills-and-receipts/>

Shahzad, A.; Kohler, G.; Knapp, M.; Gaubitzer, E.; Puchinger, M.; Edetsberger, M. Emerging applications of fluorescence spectroscopy in medical microbiology field. *Translational Medicine*. **2009**, 7, 99.

Sikorska, E.; Górecki, T.; IKhmelinskii, I.V.; Sikorski, M.; Keukeleire, D Monitoring beer during storage by fluorescence spectroscopy. *Food Chemistry*, **2006**, 96, 632–639.

Skoog, D. A, West, D. M., Holler, F. J., Crouch, S. R. Fundamentos de Química Analítica, Editora Thomson, tradução da 8ª edição, **2006**.

So, P.T.C.; Dong, C.Y. Fluorescence Spectrophotometry. encyclopedia of life sciences, macmillan publishers Ltd, *Nature Publishing*, **2002**.

Sotomayor, M.D.P.T., Dias, I.L.T., Lanza, M.R.V., Moreira, A.B., Kubota, L.T. Aplicação e avanços da espectroscopia de luminescência em análises farmacêuticas. *Química Nova*, **2008**, 31 (7), 1755-1774.

Spectroscopy Applications, Luminescence and Fluorescence Spectroscopy. Princeton Instruments. Disponível em: <http://www.phenix.bnl.gov/phenix/WWW/publish/barish/publish/wasiko/Copy/Solar/Luminescence%20and%20Fluorescence%20Spectroscopy.htm>

Syed, S.L., Agilent Technologies, Inc. Analysis of bisphenol A leaching from baby feeding bottles. Application Note. **2011**

Thompson, M. Ellison, S. L. R., Wood, R. Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis. *IUPAC. Pure and Applied Chemistry*, **2002**, 74, 835-855.

UNODC (United Nations Office on Drugs and Crime). guidance for the validation of analytical methodology and calibration of equipment used for testing of illicit drugs in seized materials and biological specimens. New York, **2009**.

U.S. Geological Survey (USGS), Emerging contaminants in the environment, **2015**. Disponível em: <http://toxics.usgs.gov/regional/emc/>

USEPA, United States Environmental Protection Agency. Bisphenol A Action Plan, **2010**.

USEPA, United States Environmental Protection Agency. Bisphenol A alternatives in thermal paper. Final Report. January **2014**.

USEPA, United States Environmental Protection Agency. Bisphenol A alternatives in thermal paper. Final Report. January **2015**.

Vandenberg, L.N., Maffini, M.V., Sonnenschein, C., Rubin, B.S., Soto, A.M., Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocrine Review*, **2009**, 30 (1), 75-95.

Vandenberg, L.N., Ehrlich, S., Belcher, S.M., Ben-Jonathan, N., Dolinoy, D.C., Hugo, E.R., Hunt, P.A., Newbold, R.R., Rubin, B.S., Soto, A.M., Wang, H.S., vom Saal, F.S. Review: Low dose effects of bisphenol A. An integrated review of in vitro, laboratory animal, and epidemiology studies. *Endocrine Disruptors*, 1,1, **2013**

Vinggaard, A.M., Körner, W., Lund, K.H., Bolz, U., Petersen, J.H. identification and quantification of estrogenic compounds in recycled and virgin paper for household use as determined by an in vitro yeast estrogen screen and chemical analysis. *Chemical Research in Toxicology*. **2000**, 13, 1214-1222

Wang, H., Zou, Y., Li, C., Wang, W., Zhang, M., Dahlgren, R.A., Wang, X. Fluorescence characteristics of bisphenol A in room temperature ionic liquids. *Journal of Fluorescence*, **2013**, 23 (6), 1157-1165.

World Health Organization. Supplementary guideline on good manufacturing practices: validation. technical report series, **2006**.

Wu, S.Y., Xu, Q., Chen, T.S., Wang, M., Yin, X.Y., Zhang, N.P., Shen, Y.T., Wen, Z.Y., Gu, Z.Z. Determination of bisphenol a in plastic bottled drinking water by high performance liquid chromatography with solid-membrane extraction based on electrospun nylon 6 nanofibrous membrane. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, **2010**, 38 (4), 503-507.

Xia, X.; Sun, H. Development of synchronous fluorescence methodology for highly sensitive and simultaneous determination of three dihydroxybenzene isomers using curve fitting. *Analytical Methods*, **2013**, 5, 6135.

Yamasaki, K; Noda, S; Imatanaka, N; Yakabe, Y. Comparative study of the uterotrophic potency of 14 chemicals in a uterotrophic assay and their receptor-binding affinity. *Toxicology Letters*, **2004**, 146, 111-120.

Yang, Y., Lu, L., Zhang, J., Yang, Y., Wu, Y., Shao, B. Simultaneous determination of seven bisphenols in environmental water and solid samples by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **2014**, 1328 (7), 26-34.

Yang, F.; Wilkinson, M.; Austin, E.J.; O'Donnell, K.P. Origin of the Stokes Shift: A Geometrical Model of Exciton Spectra in 2D Semiconductors. *Physical Review Letters*, **1993**, 70 (3), 323-326.

Zhou, Y., Chen, M., Zhao, F., Mu, D., Zhang, Z. Hu, J. Ubiquitous Occurrence of Chlorinated Byproducts of Bisphenol A and Nonylphenol in Bleached Food Contacting Papers and Their Implications for Human Exposure. *Environmental Science & Technology*, **2015**, 49 (12), 7218–7226.

Zhou, N.; Luo, H.D.; Li, N.; Jia, Y.Z.; Li, Y.Q. Highly sensitive and selective spectrofluorimetric approach for the rapid determination of trace benzo[a]pyrene in drinking water and in solutions leached from disposable paper cups. *Luminescence*, **2011**, 26, 35–43.