

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

GILBERTO FERREIRA LINHARES JÚNIOR

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA
CROMATOGRÁFICA PARA DETERMINAÇÃO DE BISFENOL A EM
SIMULANTES DE ALIMENTOS DE ENSAIOS DE MIGRAÇÃO**

FORTALEZA
2012

GILBERTO FERREIRA LINHARES JÚNIOR

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA
CROMATOGRÁFICA PARA DETERMINAÇÃO DE BISFENOL A EM
SIMULANTES DE ALIMENTOS DE ENSAIOS DE MIGRAÇÃO**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a PhD Elisabeth Mary Cunha da Silva

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Janete Eliza de Sá Soares

FORTALEZA
2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- L728d Linhares Júnior, Gilberto Ferreira.
Desenvolvimento e validação de metodologia cromatográfica para determinação de bisfenol A em simulantes de alimentos de ensaios de migração / Gilberto Ferreira Linhares Júnior. – 2012.
101 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Fortaleza, 2012.
Área de Concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos.
Orientação: Profa. Dra. Elisabeth Mary Cunha da Silva.
Coorientação: Profa. Dra. Janete Eliza de Sá Soares.
1. Cromatografia. 2. Alimentos – Análise. 3. Embalagem de alimentos. I. Título.

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA
CROMATOGRÁFICA PARA DETERMINAÇÃO DE BISFENOL A EM
SIMULANTES DE ALIMENTOS DE ENSAIOS DE MIGRAÇÃO**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Gilberto Ferreira Linhares Júnior

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof^a PhD Elisabeth Mary Cunha da Silva (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof^a Dr^a Janete Eliza de Sá Soares (Co-orientadora)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof^a Dr^a Adriana Nunes Correia (Membro)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof^a Dr^a Teresa Maria de Jesus Ponte Carvalho (Membro)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof^o Dr. Pedro de Lima Neto (Membro)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

À Professora Elisabeth, pela atenção e orientação anterior e contemporânea a este trabalho.

À Professora Janete Eliza, também pela orientação e apoio, principalmente nos momentos mais complicados que enfrentei durante a realização deste trabalho.

À Professora Teresa, sempre prestativa no dia-a-dia de trabalho, além das orientações imprescindíveis ao desenvolvimento deste projeto.

Ao amigo Breno Moreira, pelo inestimável apoio em todos os aspectos. Sem sua ajuda jamais teria chegado aos resultados que aqui apresento.

Ao Juliano, pela mão amiga sempre presente durante estes longos meses de trabalho.

À Lívia Guimarães, também o meu muito obrigado pela ajuda.

À Darcielle, pelo auxílio e atenção prestados a esta dissertação.

À Lívia Falcão, pela prestatividade.

À Professora Adriana Nunes, pela insubstituível participação na correção e melhoramento deste trabalho.

À Universidade Federal do Ceará (UFC), em especial ao Departamento de Tecnologia de Alimentos (DETAL), pelo ensino e oportunidade de realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro para que pudesse me dedicar exclusivamente ao mestrado.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de metodologia cromatográfica para determinação de bisfenol A em quatro diferentes simulantes de alimentos utilizando cromatografia líquida de alta eficiência e detector de arranjo de diodo (PDA) para suporte em ensaios de migração. Os simulantes utilizados foram A (água purificada), B (solução aquosa de ácido acético a 3%), C (solução aquosa de etanol a 10%) e D (solução aquosa de etanol a 95%). A avaliação preliminar das condições de análise foi conduzida com a finalidade de estabelecer aquelas que conferem os melhores resultados, os quais foram o sistema de fase móvel acetonitrila-água na proporção volumétrica 70:30, a temperatura de 40 °C do forno da coluna e o comprimento de onda do detector em 201 nm. O tempo de retenção do bisfenol A encontrado foi de 3,25 minutos. Para os simulantes, o método de tratamento consistiu da evaporação de 1 ml de amostra a 60 °C com duração de 1 hora e 45 minutos (A e C), 2 horas (B) e 1 hora (D). Em sequência, o método foi avaliado com relação aos parâmetros de validação analítica, incluindo linearidade, limite de detecção e de quantificação, repetibilidade, precisão intermediária entre analistas diferentes e entre dias diferentes, recuperação, seletividade e robustez. O método desenvolvido para o simulante A apresentou coeficiente de determinação (r^2) 0,9988 ou superior no intervalo testado (50 a 2000 ppb); limite de detecção e de quantificação, respectivamente, 14,7 ppb e 48,9 ppb; coeficientes de variação para repetibilidade de 2,07%, para a precisão inter-dias de 1,05% e para a precisão inter-analistas de 1,76%; recuperação de 97,9% (CV= 1,3%) (50 ppb), 99,2% (CV= 0,7%) (1000 ppb) e 103,6% (CV= 0,4%) (2000 ppb). Os resultados obtidos para o simulante B incluem coeficiente de determinação (r^2) 0,9972 ou superior; limite de detecção e de quantificação, respectivamente, 7,8 ppb e 26,0 ppb; coeficientes de variação para repetibilidade de 3,74% , precisão inter-dias de 0,14% e precisão inter-analistas de 0,2%; recuperação de 94,8% (CV= 4,8%) (50 ppb), 99,8% (CV= 0,2%) (1000 ppb) e 92,3% (CV= 1,2%) (2000 ppb). Para o simulante C os resultados incluem coeficiente de determinação (r^2) 0,9988 ou superior; limite de detecção e de quantificação, respectivamente, 4,8 ppb e 16,1 ppb; coeficientes de variação para repetibilidade de 2,84%, precisão inter-dias de 1,37% e precisão inter-analistas de 0,14%; recuperação de 104,6% (CV= 2,5%) (50 ppb), 99,8% (CV= 1,3%) (1000 ppb) e 102,5% (CV= 2,9%) (2000 ppb). Os resultados para o simulante D foram r^2 0,9984 ou superior; limite de detecção e de quantificação, respectivamente, 13,7 ppb e 45,6 ppb;

coeficiente de variação para repetibilidade de 2,0%, precisão inter-dias de 1,9% e precisão inter-analistas de 1,2%; recuperação de 92,6% (CV= 1,76%) (50 ppb), 99,9% (CV= 0,9%) (1000 ppb) e 104,8% (CV= 2,7%) (2000 ppb). Não foram observados interferentes importantes para o método testado, mostrando-se robusto.

Palavras-chave: Bisfenol A; ensaios de migração; cromatografia líquida de alta eficiência; desenvolvimento de metodologia analítica; validação de metodologia analítica.

ABSTRACT

The aim of this work was to develop analytical methodology for assessment of bisphenol A in four different food simulants using high performance liquid chromatography and diode array detector – PDA for supporting migration assay. The simulants used were A (purified water), B (water solution of 3% acetic acid), C (water solution of 10% ethylic alcohol) e D (water solution of 95% ethylic alcohol). A preliminary assessment of the analysis conditions, including mobile phase, column oven temperature and detector wavelength was conducted. Acetonitrile-water (70:30) as mobile phase, column oven temperature of 40 °C and the detector wavelength at 201 nm were the conditions that showed the best results. The retention time of bisphenol A stood at 3.25 minutes. For the simulants, the treatment methods consisted of evaporating 1 ml of sample at 60 °C for 1 hour and 45 minutes (A and C), 2 hours (B) and 1 hour (D). Once developed, the method was tested to validate analytical parameters including linearity, limit of detection and quantification, repeatability, intermediate precision between different analysts and between different days, recovery, selectivity and robustness. The method for simulant A showed a determination coefficient (r^2) of 0.9988 or higher in the range tested (50 to 2000 ppb), detection limit and quantification, respectively, 14.7 ppb and 48.9 ppb, coefficient of variation for repeatability, inter-day and inter-analyst precision, respectively, 2.07%, 1.05% and 1.76%, recovery of 97.9% (RSD= 1.3%) (50 ppb), 99.2% (RSD= 0.7%) (1000 ppb) and 103.6% (RSD= 0.4%) (2000 ppb). The results for the simulant B included a determination coefficient (r^2) of 0.9972 or higher, limit of detection and quantification, respectively, 7.8 ppb and 26.0 ppb, coefficient of variation for repeatability, inter-day and inter-analysts precision, respectively, 3.74%, 0.14% and 0.2%, recovery of 94.8% (RSD= 4.8%) (50 ppb), 99.8% (RSD= 0.2%) (1000 ppb) and 92.3% (RSD= 1.2%) (2000 ppb). For the simulant C, results included a determination coefficient (r^2) of 0.9988 or higher, limit of detection and quantification, respectively, 4.8 ppb and 16.1 ppb, coefficient of variation for repeatability, inter-day and inter-analyst precision, respectively, 2.84%, 1.37% and 0.14% ,recovery of 104.6% (RSD= 2.5%) (50 ppb), 99.8% (RSD= 1.3%) (1000 ppb) and 102.5% (RSD= 2.9%) (2000 ppb). The results of simulant D were r^2 of 0.9984 or higher, limits of detection and quantification, respectively, 13.7 ppb and 45.6 ppb, coefficient of variation for repeatability, inter-day and inter-analysts precision, respectively , 2.0%, 1.9% and 1.2%, recovery of 92.6% (RSD= 1.76%) (50 ppb), 99.9%

(RSD= 0.9%) (1000 ppb) and 104.8% (RSD= 2.7%) (2000 ppb). No significant interferences were observed for the method tested and it proved to be robust.

Keywords: Bisphenol A; Migration assay; High Performance Liquid Chromatography; Analytical Methodology Development; Analytical Methodology Validation.

LISTA DE FIGURAS

1. Estrutura química do bisfenol A	23
2. Principais vias de biotransformação do bisfenol A em humanos e roedores	26
3. Interações possíveis entre o alimento e a embalagem	32
4. Ilustração esquemática apresentando o método de tratamento utilizado para o simulante A (água purificada)	39
5. Ilustração esquemática apresentando o método de tratamento utilizado para o simulante B (solução de ácido acético 3%)	40
6. Ilustração esquemática apresentando o método de tratamento utilizado para o simulante C (solução de etanol 10%)	40
7. Ilustração esquemática apresentando o método de tratamento utilizado para o simulante D (solução de etanol 95%)	40
8. Gráfico da relação entre gasto de acetonitrila e contribuição percentual de acetonitrila na fase móvel	46
9. Cromatogramas obtidos utilizando fases móveis com diferentes proporções acetonitrila:água (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, temperatura ambiente de forno de coluna, coluna de fase reversa C ₁₈ , 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm, detecção a 228 nm)	48
10. Cromatogramas obtidos utilizando diferentes temperaturas no forno da coluna (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, coluna de fase reversa C ₁₈ , 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm, detecção a 228 nm)	49
11. Gráfico da relação entre o gasto de acetonitrila e a temperatura do forno da coluna	50
12. Espectrograma relacionando tempo de retenção, intensidade da resposta e comprimento de onda (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, coluna de fase reversa C ₁₈ , 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)	51
13. Cromatogramas obtidos nos comprimentos de onda de 228 e 201 nm (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, coluna de fase reversa C ₁₈ , 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)	52
14. Primeira curva de calibração para o simulante A (eluição isocrática, fluxo de 1	

ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, comprimento de onda do detector 201 nm, coluna de fase reversa C ₁₈ , 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)	53
15. Segunda curva de calibração para o simulante A (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, comprimento de onda do detector 201 nm, coluna de fase reversa C ₁₈ , 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)	53
16. Terceira curva de calibração para o simulante A (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, comprimento de onda do detector 201 nm, coluna de fase reversa C ₁₈ , 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)	54
17. Cromatograma obtido no ensaio utilizado para avaliação da especificidade do método desenvolvido para o simulante A, e cromatograma típico do bisfenol A 1000 ppb (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, comprimento de onda do detector 201 nm, coluna de fase reversa C ₁₈ , 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)	58
18. Primeira curva de calibração para o simulante B (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, comprimento de onda do detector 201 nm, coluna de fase reversa C ₁₈ , 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)	60
19. Segunda curva de calibração para o simulante B (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40°C, comprimento de onda do detector 201 nm, coluna de fase reversa C ₁₈ , 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)	60
20. Terceira curva de calibração para o simulante B (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, comprimento de onda do detector 201 nm, coluna de fase reversa C ₁₈ , 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)	61
21. Cromatograma obtido no ensaio utilizado para avaliação da especificidade do método desenvolvido para o simulante B, e cromatograma típico do bisfenol A 1000 ppb (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, comprimento de onda do detector 201 nm, coluna de fase reversa C ₁₈ , 250 mm	

x 4,6 mm, partícula de 10 µm)	65
22. Primeira curva de calibração para o simulante C (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetoneitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, coluna de fase reversa C ₁₈ , 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)	67
23. Segunda curva de calibração para o simulante C (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetoneitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, coluna de fase reversa C ₁₈ , 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)	67
24. Terceira curva de calibração para o simulante C (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetoneitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, coluna de fase reversa C ₁₈ , 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)	68
25. Cromatograma obtido no ensaio utilizado para avaliação da especificidade do método desenvolvido para o simulante C e cromatograma típico do bisfenol A 1000 ppb (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetoneitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, comprimento de onda do detector 201 nm, coluna de fase reversa C ₁₈ , 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)	72
26. Primeira curva de calibração para o simulante D (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetoneitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, comprimento de onda do detector 201 nm, coluna de fase reversa C ₁₈ , 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)	74
27. Segunda curva de calibração para o simulante D (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetoneitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, comprimento de onda do detector 201 nm, coluna de fase reversa C ₁₈ , 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)	74
28. Terceira curva de calibração para o simulante D (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetoneitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, comprimento de onda do detector 201 nm, coluna de fase reversa C ₁₈ , 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)	75
29. Cromatograma obtido no ensaio utilizado para avaliação da especificidade do método desenvolvido para o simulante D, e cromatograma típico do bisfenol A 1000 ppb (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetoneitrila-água	

70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, comprimento de onda do detector 201 nm, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm) 79

LISTA DE TABELAS

1. Produção de bisfenol A por país, em termos absoluto e relativo	24
2. Concentração de bisfenol A em alimentos variados	28
3. Sistemas de fase móvel testados no ensaio preliminar das condições de análise...	37
4. Concentrações de bisfenol A utilizadas nas curvas de calibração, e relação entre as mesmas e o ponto médio em termos percentuais	41
5. Volumes e soluções utilizadas para o preparo dos diferentes pontos de concentração de bisfenol A utilizados nas curvas de calibração (solução de trabalho 1: 1 µg/ml ou 1 ppm de bisfenol A; solução de trabalho 2: 10 µg/ml ou 10 ppm de bisfenol A)	42
6. Condições testadas nos ensaios para determinação da robustez (condições padrão: fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água (70:30), volume de injeção 25 µl, temperatura do forno da coluna a 40 °C e detector UV a 201 nm)	45
7. Gasto de acetonitrila segundo fase móvel testada	46
8. Gasto de acetonitrila segundo temperatura do forno da coluna	49
9. Resultados do ensaio de repetibilidade para o simulante A (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, coluna de fase reversa C ₁₈ , 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)	55
10. Resultados do ensaio de precisão realizado em um mesmo dia pelo mesmo analista para o simulante A (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, coluna de fase reversa C ₁₈ , 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)	55
11. Resultados do ensaio de precisão realizado em dias diferentes por analistas diferentes para o simulante A (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, coluna de fase reversa C ₁₈ , 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)	56
12. Resultados para o ensaio de recuperação em baixa concentração (50 ppb) para o simulante A (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, coluna de fase reversa C ₁₈ , 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)	57
13. Resultados para o ensaio de recuperação em média concentração (1000 ppb) para o simulante A (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel	

acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, coluna de fase reversa C ₁₈ , 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)	57
14. Resultados para o ensaio de recuperação em alta concentração (2000 ppb) para o simulante A (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, coluna de fase reversa C ₁₈ , 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)	58
15. Resultados obtidos para o ensaio de robustez do método desenvolvido para o simulante A, onde TR é o tempo de retenção, TRR é o tempo de retenção relativo ao padrão, R é a resposta obtida na condição testada e RR é a resposta relativa ao padrão (condições padrão: fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água (70:30), volume de injeção 25 µl, temperatura do forno da coluna a 40 °C e detector UV a 201 nm)	59
16. Resultados do ensaio de repetibilidade para o simulante B (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, coluna de fase reversa C ₁₈ , 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)	62
17. Resultados do ensaio de precisão realizado em dias diferentes pelo mesmo analista para o simulante B (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, coluna de fase reversa C ₁₈ , 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)	62
18. Resultados do ensaio de precisão realizado em um mesmo dia por analistas diferentes para o simulante B (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, coluna de fase reversa C ₁₈ , 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)	63
19. Resultados para o ensaio de recuperação em baixa concentração (50 ppb) para o simulante B (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, coluna de fase reversa C ₁₈ , 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)	64
20. Resultados para o ensaio de recuperação em média concentração (1000 ppb) para o simulante B (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, coluna de fase reversa C ₁₈ , 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)	64
21. Resultados para o ensaio de recuperação em alta concentração (2000 ppb) para o simulante B (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-	

água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, coluna de fase reversa C ₁₈ , 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)	65
22. Resultados obtidos para o ensaio de robustez do método desenvolvido para o simulante B, onde TR é o tempo de retenção, TRR é o tempo de retenção relativo ao padrão, R é a resposta obtida na condição testada e RR é a reposta relativa ao padrão (condições padrão: fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água (70:30), volume de injeção 25 µl, temperatura do forno da coluna a 40 °C e detector UV a 201 nm)	66
23. Resultados do ensaio de repetibilidade para o simulante C (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, coluna de fase reversa C ₁₈ , 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)	69
24. Resultados do ensaio de precisão realizado em dias diferentes pelo mesmo analista para o simulante C (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, coluna de fase reversa C ₁₈ , 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)	69
25. Resultados do ensaio de precisão realizado em dias diferentes por analistas diferentes para o simulante C (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, coluna de fase reversa C ₁₈ , 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)	70
26. Resultados para o ensaio de recuperação em baixa concentração (50 ppb) para o simulante C (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, coluna de fase reversa C ₁₈ , 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)	71
27. Resultados para o ensaio de recuperação em média concentração (1000 ppb) para o simulante C (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, coluna de fase reversa C ₁₈ , 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)	71
28. Resultados para o ensaio de recuperação em alta concentração (2000 ppb) para o simulante C (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, coluna de fase reversa C ₁₈ , 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)	72
29. Resultados obtidos para o ensaio de robustez do método desenvolvido para o simulante C, onde TR é o tempo de retenção, TRR é o tempo de retenção	

relativo ao padrão, R é a resposta obtida na condição testada e RR é a resposta relativa ao padrão (condições padrão: fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água (70:30), volume de injeção 25 µl, temperatura do forno da coluna a 40 °C e detector UV a 201 nm)	73
30. Resultados do ensaio de repetibilidade para o simulante D (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, coluna de fase reversa C ₁₈ , 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)	76
31. Resultados do ensaio de precisão realizado em dias diferentes pelo mesmo analista para o simulante D (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, coluna de fase reversa C ₁₈ , 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)	76
32. Resultados do ensaio de precisão realizado em um mesmo dia por analistas diferentes para o simulante D (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, coluna de fase reversa C ₁₈ , 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)	77
33. Resultados para o ensaio de recuperação em baixa concentração (50 ppb) para o simulante D (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, coluna de fase reversa C ₁₈ , 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)	78
34. Resultados para o ensaio de recuperação em média concentração (1000 ppb) para o simulante D (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, coluna de fase reversa C ₁₈ , 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)	78
35. Resultados para o ensaio de recuperação em alta concentração (2000 ppb) para o simulante D (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, coluna de fase reversa C ₁₈ , 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)	79
36. Resultados obtidos para o ensaio de robustez do método desenvolvido para o simulante D, onde TR é o tempo de retenção, TRR é o tempo de retenção relativo ao padrão, R é a resposta obtida na condição testada e RR é a resposta relativa ao padrão (condições padrão: fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água (70:30), volume de injeção 25 µl, temperatura do forno da	

coluna a 40 °C e detector UV a 201 nm)	80
37. Resultados obtidos para a validação do método desenvolvido para determinação de bisfenol A em simulantes de alimentos	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-UV	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector ultravioleta
CL-DE	Cromatografia Líquida com Detector Eletroquímico
CL-EM	Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa
CL-FL	Cromatografia Líquida com Detector de Fluorescência
CV	Coefficiente de Variação
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
EU	<i>European Union</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatograph</i>
IDA	Ingestão Diária Aceitável
LC-UV	<i>Liquid Chromatography with Ultraviolet Detector</i>
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MERCOSUL	Mercado Comum do Sul
NOAEL	<i>Non-Observed-Adverse-Effect Level</i>
PDA	<i>Photodiode array detector</i>
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SML	<i>Specific Migration Limit</i>
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. REFERENCIAL TEÓRICO	23
2.1 Bisfenol A	23
2.1.1 <i>Características e aplicação</i>	23
2.1.2 <i>Aspectos toxicológicos</i>	25
2.1.3 <i>Presença nos alimentos</i>	27
2.1.4 <i>Aspectos legais</i>	28
2.1.5 <i>Métodos de análise em alimentos</i>	29
2.1.5.1 <i>Cromatografia de alta eficiência para análise de bisfenol A</i>	30
2.2 Embalagens de alimentos	31
2.2.1 <i>Interações alimento-embalagem</i>	31
2.2.2 <i>Ensaio de migração</i>	32
3. OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo geral	34
3.2 Objetivos específicos	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 Materiais	35
4.1.1 <i>Reagentes e soluções analíticas</i>	35
4.1.2 <i>Equipamentos e materiais</i>	35
4.2 Metodologia	37
4.2.1 <i>Avaliação preliminar das condições de análise</i>	37
4.2.1.1 <i>Sistema fase móvel</i>	37
4.2.1.2 <i>Temperatura do forno da coluna</i>	38
4.2.1.3 <i>Comprimento de onda do detector</i>	39
4.2.2 <i>Tratamento da amostra</i>	39
4.2.3 <i>Validação do método analíticos desenvolvido</i>	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1 Avaliação preliminar das condições de análise	46
5.1.1 <i>Sistema de fase móvel</i>	46
5.1.2 <i>Temperatura do forno da coluna</i>	49
5.1.3 <i>Comprimento de onda do detector</i>	51
5.2 Simulante A	52

5.3 Simulante B	60
5.4 Simulante C	67
5.5 Simulante D	74
5.6 Considerações finais	81
6. CONCLUSÕES	84
REFERÊNCIAS	85
APÊNDICE A	90
APÊNDICE B	93
APÊNDICE C	96
APÊNDICE D	99

1 INTRODUÇÃO

Os contaminantes químicos de alimentos são uma crescente preocupação de saúde pública, principalmente no que se refere a intoxicações crônicas oriundas de exposições prolongadas a baixas concentrações destas substâncias. Dentre os contaminantes químicos destaca-se o bisfenol A, por sua contaminação indireta através da sua cedência a partir das embalagens para os alimentos ali contidos.

Desta forma, a exposição humana ao bisfenol A ocorre principalmente por meio da dieta, embora ocorra também tanto ocupacionalmente como pela água de consumo humano (DOERGE *et al.*, 2010).

O bisfenol A é um composto alquifenólico muito utilizado desde a década de 1940 para a confecção de plásticos policarbonatos duros e resinas epóxi, como também para revestimentos de embalagens metálicas de alimentos e bebidas. É um composto industrial, com ação antioxidante, não biodegradável e altamente resistente à degradação química, produzido em larga escala em todo o mundo, sendo a estimativa do total utilizado pela União Europeia de aproximadamente 1,15 milhões de toneladas por ano (BERONIUS *et al.*, 2010; DAAS & HAMDAOUI, 2010).

As embalagens de alimentos compostas de policarbonatos, apesar da vantagem da durabilidade, liberam bisfenol A, estando assim associadas a efeitos deletérios do bisfenol A em humanos (ERLER & NOVAK, 2010). O bisfenol A pode ser eliminado mediante tratamentos físicos, químicos e biológicos e encontrado em fluidos biológicos e comidas enlatadas (DAAS & HAMDAOUI, 2010), contudo as suas quantidades residuais, mesmo na ordem nano, conferem risco à saúde humana.

Sabe-se que o monômero ou o dímero de bisfenol A podem sofrer migração para alimentos e bebidas após o aquecimento das latas ou de outros recipientes, durante o processo de estabilização e estocagem, sendo então passíveis de absorção pelo organismo humano. Resíduos do composto foram encontrados em vegetais, alimentos infantis, bebidas, produtos cárneos e pescado, todos enlatados (NAKAMURA *et al.*, 2010; GRUMETTO *et al.*, 2008; KANG & KONDO, 2002).

O bisfenol A é considerado um disruptor endócrino, pois interfere no sistema hormonal, promovendo a proliferação de células de câncer de mama MCF-7 responsivas a estrógeno, a hiperprolactinemia e a proliferação de células epiteliais do útero e da vagina em camundongos fêmeas ovariectomizadas. Em contrapartida, em animais machos observou-se a sua ação na diminuição o peso da próstata, testículos, epidídimos

e vesícula seminal, além de diminuir os níveis de testosterona e a contagem de espermatozoides (NAKAMURA *et al.*, 2010).

Decorrente do conhecimento das ações danosas do bisfenol A ao organismo humano, vários países, através das suas instituições pertinentes, vêm tomando medidas de segurança e controle da presença deste contaminante.

A União Europeia estabeleceu uma Ingestão Diária Aceitável (IDA) para o bisfenol A de 0,05 mg/kg de peso corpóreo por dia, valor este derivado do *Non-Observed-Adverse-Effect Level* (NOAEL) aceito pela mesma instituição (5mg/kg) em razão do fator de segurança 100. A União Europeia, mediante edição da *EU Commission* 2004, ainda fixou um limite máximo de migração específica (*specific migration limit* - SML) de 0,6 mg/kg de material plástico (GÓMES, RUBIO, BENDITO, 2009).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) elaborou uma legislação que trata da migração em materiais, embalagens e equipamentos plásticos destinados a entrar em contato com alimentos. Recentemente, foi editada uma nova resolução que proíbe a presença de bisfenol A em mamadeiras (BRASIL, 2010; BRASIL, 2011).

Considerando-se que as embalagens, nas condições previsíveis de uso, não devem ceder aos alimentos substâncias que representem um risco à saúde humana, o presente trabalho objetivou o desenvolvimento e a validação de metodologia cromatográfica para a determinação de bisfenol A em quatro simulantes de alimentos (água destilada, solução de ácido acético 3% em água destilada, solução de etanol 10% em água destilada e solução de etanol 95% em água destilada) a serem usados em ensaios de migração do bisfenol A em embalagens plásticas acondicionadoras de alimentos, de forma que tal metodologia desenvolvida fornecerá suporte aos ensaios de migração, e estes, por sua vez, subsídios às ações de vigilância sanitária frente à presença deste contaminante em alimentos (BRASIL, 2010).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Bisfenol A

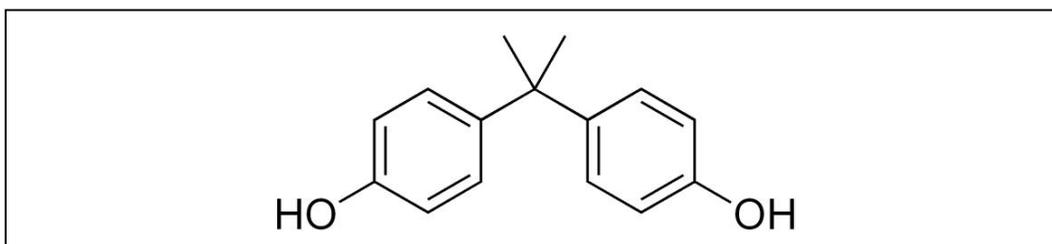
2.1.1 Características e aplicação

Bisfenóis constituem uma classe de compostos difenilalcanos, sendo o bisfenol A, nome comum para o 2,2-bis (4,4'-dihidroxifenil) propano, 4,4'-isopropileno-difenol ou ainda 2,2'-bis(4-hidroxifenil) propano o representante de maior expressão na atualidade.

O bisfenol A foi primeiramente descrito por Dianin em 1891, tendo sido sintetizado pela primeira vez por Zincke em 1905 (HUANG *et al.*, 2011).

O composto apresenta massa molecular 227, pKa em 9,7, solubilidade em água de 89 mg/ml (GÓMES, RUBIO, BENDITO, 2009), baixa pressão de vapor (DEKANT & VÖLKEL, 2008), baixa volatilidade e se encontra no estado sólido à temperatura ambiente (HUANG *et al.*, 2011). A Figura 1 apresenta a estrutura química do bisfenol A.

Figura 1- Estrutura química do bisfenol A.



O bisfenol A é um composto industrial produzido em larga escala em todo o mundo (BERONIUS *et al.*, 2010; DAAS & HAMDAOUI, 2010). O composto é sintetizado em meio ácido, pela condensação de acetona com dois grupos fenol (MITA *et al.*, 2011). Segundo Maia *et al.* (2010), a demanda mundial de bisfenol A cresce entre 6 e 10% por ano. A molécula apresenta grande utilização desde a quarta década do século XX para a confecção de plásticos policarbonatos duros, resinas epóxi e de resinas poliésterestireno insaturadas. A Tabela 1 apresenta a produção de bisfenol A por país.

Tabela 1 – Produção de bisfenol A em alguns países, em termos absoluto e relativo.

País	Capacidade produtiva (10³ toneladas/ano)	Percentual (%)
USA	1075	29,5
Alemanha	456	12,5
Países baixos	410	11,3
Taiwan	615	16,9
Japão	611	16,7
Espanha	280	7,7
Rússia	165	4,5
Brasil	27	0,7
Total	3639	100,0

Fonte: Huang *et al.*, 2011 (modificada)

As aplicações do bisfenol A podem ser divididas em duas categorias: uma categoria predominante, onde o composto sofre modificação estrutural ou polimerização, e uma segunda minoritária, onde o mesmo é utilizado como aditivo. Dentre os polímeros cuja composição inclui o bisfenol A têm-se o policarbonato (65% dos polímeros produzidos) e as resinas epóxi como principais (30% dos polímeros produzidos), além de outros menos comuns, como polissulfona, poliacrilatos, polieterimida, tetrabromobisfenol-A, poliésteres insaturados, resinas bisfenol-A formaldeído e benzoxazinas. A utilização como aditivo, por sua vez, se faz principalmente no papel térmico (como desenvolvedor fenólico) e no polivinilcloreto (PVC), como inibidor de polimerização do cloreto de vinila (GEENS, GOEYENS, COVACI, 2011).

Na primeira categoria podem ocorrer resíduos de monômero de bisfenol A após reação incompleta ou como produto de degradação do polímero (mais raramente). Na forma de aditivo, o bisfenol A não forma ligações covalentes com as moléculas do polímero, podendo migrar facilmente para o meio exterior (GEENS, GOEYENS, COVACI, 2011).

O bisfenol A é utilizado, em menores proporções, em fluidos de freio hidráulicos, na indústria de pneus, em placas de circuitos impressos, em adesivos, em selantes dentários e em ferramentaria. E, entre outros usos, atua como agente antioxidante e retardante de chamas (GEENS, GOEYENS, COVACI, 2011; AYALLA, MOYANO, GALCERAN, 2010; SAAL & WELSHONS, 2006; BALAKRISHNAN *et al.*, 2010).

2.1.2 Aspectos Toxicológicos

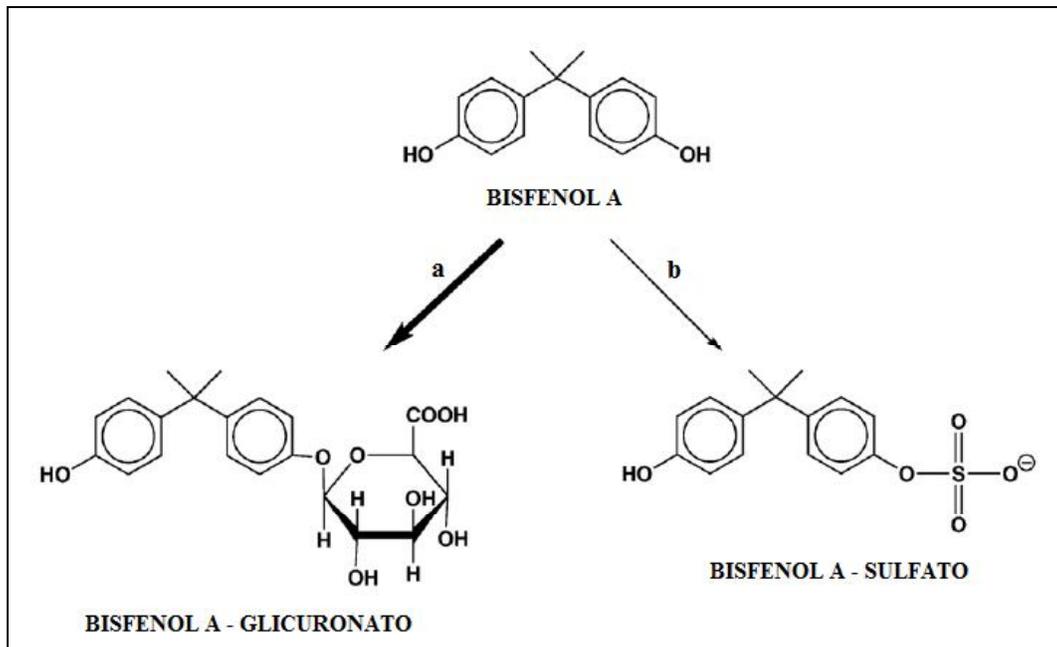
Após administração oral, o bisfenol A é rápida e eficientemente absorvido através do trato gastrointestinal (> 95 % da dose). O bisfenol A apresenta capacidade de atravessar a barreira placentária e pode causar anormalidades no feto (PALANZA *et al.*, 2006; PRINS *et al.*, 2007; DONG, TERASAKA, KIYAMA, 2011). O composto sofre biotransformação na mucosa intestinal e extenso efeito de primeira passagem hepático, podendo ser inclusive completo. A conjugação com o ácido glicurônico é a principal rota de biotransformação deste xenobiótico em primatas e roedores, enquanto a sulfatação ocorre em menor grau (DEKANT & VÖLKEL, 2008). Tanto a glicuronidação como a sulfatação são consideradas reações de detoxificação, pois em ambas os metabólitos produzidos são isentos de atividade estrogênica (HANIOKA, NAITO, NARIMATSU, 2008; YOKOTA *et al.*, 1999; DEKANT & VÖLKEL, 2008). Estudos demonstraram a possibilidade de biotransformação oxidativa, tendo inclusive seus metabólitos maior afinidade com receptores estrogênicos, sendo, assim, um processo de bioativação (DEKANT & VÖLKEL, 2008).

A Figura 2 representa as principais rotas de biotransformação do bisfenol A em humanos e roedores.

O metabólito glicuronato é rapidamente excretado na urina, apresentando meia-vida inferior a 6 horas após administração oral. Devido à eficiência da biotransformação e da excreção, o bisfenol A não apresenta característica de bioacumulação (DEKANT & VÖLKEL, 2008). Entretanto, apesar de apresentar um tempo de meia-vida curto no organismo (< 6 h), o bisfenol A tem sido detectado em níveis superiores a 0,1 µg/L em mais de 90% das amostras de urina coletadas nos Estados Unidos. Além da urina, este agente tóxico está presente no plasma, fluido folicular, sêmen, líquido amniótico, saliva, leite materno e tecido adiposo (BLOOM *et al.*, 2011; DONG, TERASAKA, KIYAMA, 2011).

Figura 2 – Principais vias de biotransformação do bisfenol A em humanos e roedores:

a) conjugação com ácido glicurônico e b) conjugação com sulfato



Fonte: DEKANT & VÖLKEL, 2008 (modificada)

A toxicidade do bisfenol A vem sendo investigada desde os anos 70, e os resultados indicam que o mesmo não apresenta atividade genotóxica (DEKANT & VÖLKEL, 2008). O composto é classificado atualmente como um disruptor endócrino, termo definido como substância capaz de interagir com hormônios endógenos e com a sinalização química deste sistema (SERRANO, WARDEN, CABRERA, 2008).

O bisfenol A apresenta atividade estrogênica comprovada tanto *in vitro* como *in vivo* (SOTO *et al.*, 2005; VOM SAAL *et al.*, 1998), acidentalmente descoberta por Krishnan *et al.* em 1993, quando os autores perceberam que o composto sofria migração das vidrarias de policarbonato autoclavadas e aumentava a taxa de proliferação de células de câncer de mama MCF-7 (KANG & KONDO, 2002). O composto apresenta potencial de ligação a receptores estrogênicos nucleares e de membrana (tipo α e tipo β), desencadeando ação esteróide genômica e não genômica (WOZNIAK, BULAYEVA, WATSON, 2005; ASIMAKOPOULUS, THOMAIDIS, KOUPPARIS, 2011). É relatada na literatura uma atividade antagonista competitiva com hormônios endógenos (ASIMAKOPOULUS, THOMAIDIS, KOUPPARIS, 2011; WEI *et al.*, 2011).

O contaminante está relacionado a efeitos reprodutivos e sobre o desenvolvimento de organismos, apresentando atividade, inclusive, em doses bem abaixo daquelas que desenvolvem efeitos adversos em testes de avaliação de toxicidade (DEKANT & VÖLKEL, 2008). Uma pesquisa que envolveu três gerações de camundongos observou que houve redução do peso corpóreo dos animais jovens e na fase adulta, bem como dos órgãos após exposição a dosagens iguais ou superiores a 50 mg por quilograma de peso corpóreo por dia (TYL *et al.*, 2002). Trabalhos recentes indicaram o potencial do bisfenol A de interferir na atividade do hormônio tireoideano, em induzir a proliferação de células de câncer de próstata e em impedir a síntese de testosterona quando presente em doses tão baixas quanto partes por trilhão (GÓMES, RUBIO, BENDITO, 2009).

Os pesquisadores ainda divergem quanto ao biomarcador apropriado para monitorar a exposição humana ao bisfenol A, sendo o mais indicado o bisfenol A-glicuronato urinário (BERONIUS *et al.*, 2010; DEKANT & VÖLKEL, 2008).

2.1.3 Presença nos alimentos

A exposição oral durante ingestão de alimentos contaminados é a principal fonte de exposição humana ao bisfenol A (DEKANT & VÖLKEL, 2008; DOERGE *et al.*, 2011). Resíduos de bisfenol A em produtos alimentícios e água para consumo são atualmente as fontes de exposição humanas mais importantes a xenoestrógenos sintéticos na Nova Zelândia (THOMSON, CRESSEY, SHAW, 2003).

Como foi citado anteriormente, o bisfenol A está presente em diversos materiais tais como: polímeros, mormente plásticos policarbonatos duros e resinas epóxi. É importante ressaltar que plásticos policarbonatos são utilizados em embalagens alimentícias e resinas epóxi o são em vernizes alimentícios, e que ambos os materiais se encontram em contato direto com alimentos (MALONEA *et al.*, 2010). Exatamente por conta deste contato com o alimento, o bisfenol A tem a possibilidade de migrar para o mesmo, tornando-se um importante contaminante (FERRER *et al.*, 2011). De fato, é comprovada a migração do bisfenol A durante o aquecimento do processo de estabilização e estocagem, tendo sido encontrados resíduos do composto em vegetais enlatados, alimentos infantis, bebidas enlatadas e produtos cárneos e de pescado, também enlatados (GRUMETTO *et al.*, 2008; KANG & KONDO, 2002).

A Tabela 2 apresenta os níveis de bisfenol A encontrados em diversos tipos de alimentos.

Tabela 2 – Concentração de bisfenol A em alimentos variados.

Alimento	Número de amostras (número de amostras positivas quantificáveis)	Concentração de bisfenol A em amostras positivas quantificáveis (ng/g)
Leite	8 (2)	7,1 – 15,2
Peixe	8 (4)	24 – 109
Frutos do mar	5 (5)	13 – 213
Carne	6 (2)	29 – 98
Mel	107 (17)	3 – 33
Alimentos infantis	13 (11)	9 – 384
Água mineral (garrafa PET)	9 (9)	3 – 10

Fonte: GRUMETO *et al.* 2008 (modificada)

2.1.4 Aspectos legais

Estudos sobre bisfenol A têm sido desenvolvidos, entretanto vários pontos ainda permanecem obscuros, sobretudo aqueles relacionados aos níveis seguros de exposição humana ao contaminante. Por conta disso, os órgãos regulamentadores responsáveis pela segurança alimentar ainda divergem quanto aos limites aceitáveis para o bisfenol A em alimentos.

A EFSA (*European Food Safety Authority*) estabeleceu uma Ingestão Diária Aceitável (IDA) para o migrante de embalagens de 0,05 mg/kg de peso corpóreo por dia (ARNICH *et al.*, 2011). Também ficou fixado, pelo mesmo órgão regulamentador, um limite máximo de migração específica (*specific migration limit* - SML) de 0,6 mg/kg de bisfenol A a partir de materiais plásticos (GÓMES, RUBIO, BENDITO, 2009).

A *Food and Drug Administration* (FDA), agência estadunidense responsável pela área de alimentos no país, ainda não estabeleceu limites de segurança para o migrante de embalagens. Atualmente o órgão investe em estudos científicos e aguarda resultados para futura tomada de medidas preventivas.

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) elaborou uma legislação que trata de migrantes de embalagem, incluindo o bisfenol A. Vale ressaltar que o limite sugerido (IDA) é exatamente o mesmo estabelecido pela União Europeia, ou seja, 0,05 mg/kg de peso corpóreo por dia. Ensaios de migração, por sua vez, são regulamentados no território brasileiro pela RDC nº 51, de 26 de novembro de 2010 (BRASIL, 2010). Além disso, uma nova resolução que proíbe a presença de bisfenol A em mamadeiras foi posta em vigor em 16 de setembro de 2011 pela ANVISA (BRASIL, 2011).

2.1.5 Métodos de análise em alimentos

A variedade de alimentos contaminados com bisfenol A é enorme, incluindo produtos sólidos e líquidos, frescos e enlatados. Na maioria dos casos faz-se imprescindível uma extensa etapa de preparo da amostra anterior à análise. A rota mais usual inclui pré-tratamento, extração, purificação, concentração e ainda, se necessário, derivatização (GÓMES, RUBIO, BENDITO, 2009).

Em revisão de Gómes e colaboradores (2009), os autores relatam algumas considerações sobre a extração do bisfenol A, aqui resumidas: amostras sólidas costumam ser homogeneizadas, enquanto as líquidas, filtradas e centrifugadas; a extração com solventes é a técnica mais utilizada para o isolamento de bisfenol A de amostras sólidas, enquanto extração por fase sólida o é para alimentos líquidos, ambas são técnicas de alta versatilidade e simplicidade; a extração assistida por microondas e a extração líquida pressurizada são outros métodos também utilizados. Quanto aos métodos de análise, estes autores ressaltaram a necessidade de métodos altamente sensíveis e seletivos, por se tratar de um contaminante frequentemente presente em quantidades traços, e citam como os mais comuns para este fim a cromatografia líquida com detector de fluorescência (CL-FL), a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (CL-EM) e a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM), embora a cromatografia líquida com detector eletroquímico (CL-DE) e o imunoensaio sejam também aplicáveis para a análise de bisfenol A em alimentos. Quanto à cromatografia líquida com detector ultravioleta (CL-UV), Grumetto *et al.* (2008) ressaltam a sua validade, embora sua sensibilidade possa se apresentar inferior àquela que utiliza detector de fluorescência.

A cromatografia é um método físico e químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada por meio da distribuição destes em duas fases imiscíveis em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária, enquanto a outra se move através da primeira. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos pelas duas fases, de tal forma que cada um deles é seletivamente retido, resultando em velocidades diferentes de migração no sistema cromatográfico. A forma física do sistema define a técnica geral, sendo esta subdividida em cromatografia planar ou cromatografia em coluna. Considerando o estado físico da fase móvel, distingue-se a cromatografia gasosa (gás inerte), líquida (líquido capaz de interagir com os solutos) e a cromatografia supercrítica (vapor pressurizado). A cromatografia líquida em coluna se divide em cromatografia líquida “clássica”, realizada em colunas de vidro, sob pressão atmosférica, com o fluxo da fase móvel dependente da força da gravidade também denominada “cromatografia líquida por força da gravidade”, e em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), que utiliza colunas metálicas e pressões elevadas obtidas com auxílio de uma bomba de alta pressão (COLLINS, BRAGA, BONATO, 2006). Em uma rápida comparação, a cromatografia líquida é mais simples que a gasosa por não necessitar da etapa de derivatização; porém, a resolução da última técnica é superior à da primeira (GÓMES, RUBIO, BENDITO, 2009).

2.1.5.1 Cromatografia líquida de alta eficiência para análise de bisfenol A

Na cromatografia líquida de alta eficiência, a fase móvel mais utilizada para análise de bisfenol A é a mistura acetoneitrila-água, nas proporções de 40:60 v/v e 50:50 v/v, sempre em condições isocráticas (GRUMETTO *et al.*, 2008; GÓMES, RUBIO, BENDITO, 2009; KANG & KONDO, 2002). Outra fase móvel utilizada é a mistura acetato de amônio-metanol em condição gradiente (MALONEA, ELLIOTT, KENNEDYC, REGANA, 2010).

O fluxo de 1 ml/min é o mais frequente, assim como a temperatura do forno da coluna em 40 °C (GRUMETTO *et al.*, 2008; KANG & KONDO, 2002).

Os comprimentos de onda utilizados para leitura do detector UV foram 228 nm (GRUMETTO *et al.*, 2008) e 260 nm (LIU, WOLFF, MOLINE, 2005).

Os padrões internos citados na literatura para a análise de bisfenol A são ²D-Bisfenol A, ¹³C-Bisfenol A, ¹³C₁₂-Bisfenol A, ²D₁₆-Bisfenol A, bisfenol F, ¹D₁₀-Pireno e

flavona (ASIMAKOPOULUS, THOMAIDIS, KOUPPARIS, 2011; LIU, WOLFF, MOLINE, 2005).

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para a determinação de bisfenol A por CLAE-UV relatados por Yoshida *et al.* (2001) foram, respectivamente, de 3 ng/g e 10 ng/g, enquanto Grumetto *et al.* (2008) encontraram LD de 20,0 ng/g e LQ de 66,9 ng/g. Quanto à precisão, foram relatados valores de coeficiente de variação entre 0,14% e 2,20% (precisão intermediária) e de 0,04% a 1,84% (repetibilidade) para a determinação de bisfenol A por CLAE-UV (GRUMETTO *et al.*, 2008).

2.2 Embalagem de alimentos

A embalagem é extremamente importante para a garantia da qualidade de um alimento. Dentre as várias funções que lhe são atribuídas estão: a contenção, que confere a capacidade de formar uma unidade do produto; a proteção contra fatores ambientais que acelerariam sua deterioração; a informação veiculada na embalagem; a facilitação do transporte e distribuição do produto; e a garantia da venda (AZEREDO, 2004; GAVA, SILVA, FRIAS, 2009). A função considerada mais importante é a proteção, que está relacionada diretamente com a segurança do consumidor (AZEREDO, 2004).

Na produção de embalagens são utilizados diferentes materiais, podendo as mesmas serem classificadas como recipientes metálicos rígidos, recipientes metálicos flexíveis, plásticos rígidos e semi-rígidos, plásticos flexíveis, papéis flexíveis, laminados e multifoliados, caixas de papelão, embalagens de madeira, dentre outros (GAVA, SILVA, FRIAS, 2009).

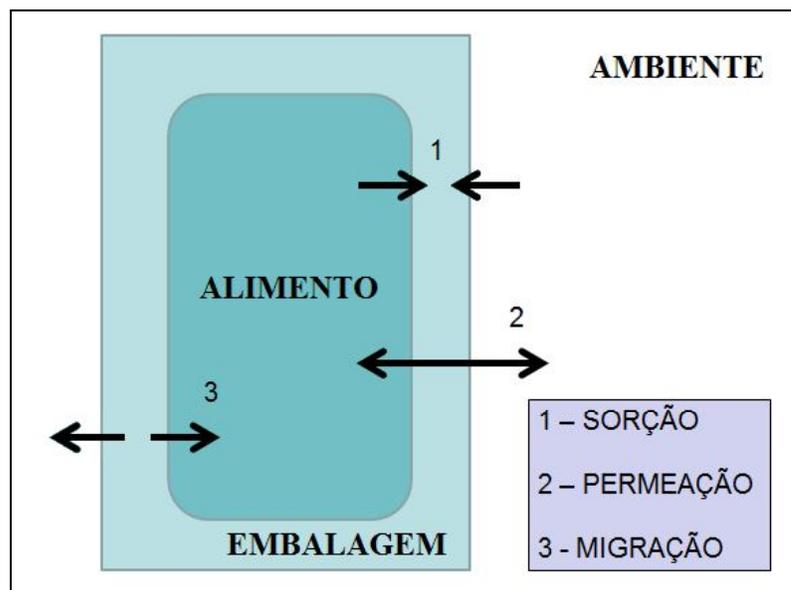
2.2.1 Interações alimento-embalagem

Processos de transmissão de massa em um sistema alimento-embalagem-ambiente são denominados como interações alimento-embalagem. A classificação mais difundida divide as interações como de migração, de sorção e de permeação. Migração é a transferência de material originalmente presente na embalagem para o alimento ou ambiente. Sorção consiste na absorção de componentes pelo material de embalagem. Permeação descreve a transferência de substâncias entre o alimento e o ambiente através da embalagem. A Figura 3 ilustra esquematicamente as interações alimento-embalagem.

A migração e a sorção são processos de difusão. A permeação, por sua vez, é função da difusividade e da solubilidade do composto químico naquela embalagem. A difusividade é dependente do peso molecular da substância, enquanto a solubilidade o é da sua polaridade (AZEREDO, 2004).

Sabe-se que os tipos de interação sofrem influência mútua. Como exemplo, a sorção pode afetar processos de migração, além de comprometer a resistência do material de embalagem. Os diferentes materiais de embalagem apresentam diferentes formas de interação com os alimentos. No que diz respeito à estabilidade de alimentos, a permeação e a migração são as interações mais importantes, tendo a migração importantes consequências toxicológicas para o consumidor (AZEREDO, 2004).

Figura 3 – Interações possíveis entre o alimento e a embalagem



2.2.2 Ensaio de migração

A migração de materiais plásticos de embalagens para alimentos têm preocupado a comunidade científica desde o início dos anos 80. De fato, por conta do fenômeno de migração, a embalagem pode ser considerada uma importante fonte de contaminação química para o alimento (LAU & WONG, 2000).

Tendo em vista que embalagens de alimentos, nas condições previsíveis de uso, não devem ceder substâncias que representem um risco à saúde humana, limites de migração total (para classes de substâncias) e limites de migração específica (para um

determinado composto) são estabelecidos para cada componente químico pelos órgãos regulamentadores. O atendimento aos limites de migração estabelecidos pela legislação é verificado por meio de ensaios de migração, quando são reproduzidas as condições normais de elaboração, fracionamento, armazenamento, distribuição, comercialização e consumo do alimento. Ensaios de migração de substâncias contidas em materiais em contato com alimentos são realizados fazendo-se uso de agentes simulantes, que são produtos que imitam o comportamento de um grupo de alimentos com características semelhantes (BRASIL, 2010).

No Brasil, os ensaios de migração envolvendo materiais plásticos em contato com alimentos são regulamentados por meio de um documento formulado pela Anvisa, a RDC nº 51, de 26 de novembro de 2010, que incorpora ao ordenamento jurídico nacional a Resolução GMC MERCOSUL nº 32/10 (BRASIL, 2010; MERCOSUL, 2010).

Para o desenvolvimento deste tipo de ensaio, o alimento ou bebida deve ser classificado em uma das seguintes categorias: alimentos aquosos não ácidos ($\text{pH} > 4,5$), aquosos ácidos ($\text{pH} < 4,5$), gordurosos (gordura ou óleos presentes na sua composição), alcoólicos (álcool $> 5\%$ em volume) e secos. Quanto aos simulantes a serem utilizados, estão inseridos a água destilada ou deionizada (Simulante A, para alimentos aquosos não ácidos), solução de ácido acético 3% em água destilada ou deionizada (Simulante B, para alimentos aquosos ácidos), solução de etanol 10% em água destilada ou deionizada (Simulante C, para alimentos alcoólicos), solução de etanol 95% em água destilada ou deionizada, isooctano ou óxido de polifenileno modificado (Simulante D) e ainda azeites/óleos comestíveis (azeite de oliva, óleo de milho ou girassol) ou misturas sintéticas de triglicérides (Simulante D'). Para alimentos gordurosos foi estabelecida a utilização do simulante D ou simulante D' (BRASIL, 2010).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Desenvolver e validar metodologia cromatográfica para a determinação de bisfenol A em simulantes de alimentos para subsidiar ensaios de migração.

3.2 ESPECÍFICOS

- Estabelecer as melhores condições de análise para o bisfenol A por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando detector de arranjo de diodo, incluindo sistema fase móvel, temperatura do forno da coluna e comprimento de onda do detector.
- Determinar o tempo de retenção do bisfenol A nas condições analíticas estabelecidas como excelentes.
- Desenvolver métodos adequados de tratamento para cada um dos quatro simulantes de alimento.
- Determinar os parâmetros de validação do método desenvolvido, incluindo linearidade, limites de detecção e de quantificação, repetibilidade, precisão intermediária, recuperação, seletividade e robustez.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Reagentes e soluções analíticas

O padrão analítico de bisfenol A (> 99%) foi obtido da Sigma (Sigma-Aldrich, EUA). Os reagentes utilizados foram: acetonitrila grau HPLC (J. T. Baker), ácido acético grau HPLC (J. T. Baker) etanol grau HPLC (J. T. Baker). Para o preparo de soluções e eluentes, a água purificada utilizada obtida pelo sistema Purelab Option.

Para o preparo da solução estoque pesou-se 100,0 mg de bisfenol A padrão e transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 200 ml. Completou-se o frasco com mistura acetonitrila/água (40:60), sendo a concentração final de bisfenol A na solução igual a 500 µg/ml (500 ppm). A solução permaneceu armazenada ao abrigo da luz e sob refrigeração (-3 °C).

A solução de trabalho 1 foi preparada como segue: transferiu-se quantitativamente 200 µl da solução estoque para balão volumétrico de 100 ml. Completou-se o balão com acetonitrila-água (40:60), sendo a concentração final de bisfenol A na solução igual a 1 µg/ml (1 ppm). As condições de armazenamento da solução foram idênticas às da solução estoque.

Para o preparo da solução de trabalho 2, por sua vez, transferiu-se quantitativamente 2 ml da solução estoque para balão volumétrico de 100 ml. Completou-se o balão com acetonitrila-água (40:60), sendo a concentração final de bisfenol A na solução igual a 10 µg/ml (10 ppm). O armazenamento seguiu as mesmas condições já citadas para a solução estoque.

4.1.2 Equipamentos e materiais

Foi utilizado concentrador rotacional modelo RVC 2-33 CD plus (Christ-Alemanha), equipamento CLAE Accela 600 (Thermo-EUA), com controle e aquisição de dados por microcomputador e detector de arranjo de diodo (Thermo-EUA). A coluna cromatográfica utilizada apresentava as seguintes especificações: C₁₈ simétrica (250 mm x 4,6 mm), tamanho de partícula de 10 µm (Thermo-EUA). O sistema Purelab Option, 18,2 mΩ (ELGA) foi utilizado como purificador de água. Também foram

utilizados os pipetadores automáticos Neo P20N, Neo P200N e Neo P1000N, todos contidos no *Pipetman Neo STARTER KIT* (GILSON-EUA). Para pesagem foi utilizada a balança analítica HP-200 (Analítica). Foram utilizadas vidrarias gerais de laboratório, tais como béqueres de 25 ml, provetas graduadas de 100 ml, balões volumétricos de 100 ml e tubos de ensaio de 10 ml.

4.2 Metodologia

4.2.1 Avaliação preliminar das condições de análise

Testes preliminares foram realizados em triplicata para a determinação das melhores condições de análise do bisfenol A no CLAE utilizando detector PDA (UV). A solução de trabalho 2 foi utilizada em todos os ensaios.

Faz-se *mister* ressaltar que, para se evitar possíveis interferências durante a avaliação da influência de cada variável analítica, todas as outras foram mantidas constantes.

4.2.1.1 Sistema fase móvel

Foi selecionado o sistema acetonitrila-água como eluente mais adequado para a análise, tendo como base a literatura (GRUMETTO *et al.*, 2008; GÓMES, RUBIO, BENDITO, 2009; KANG & KONDO, 2002). A variável analisada neste teste foi a proporção entre os dois solventes, sempre em condições isocráticas. A Tabela 3 apresenta as fases móveis deste ensaio.

Tabela 3 – Sistemas de fase móvel testadas no ensaio preliminar das condições de análise. Condições de análise: fluxo 1 ml/min, temperatura do forno da coluna ambiente, volume de injeção 25 µl, comprimento de onda do detector 228 nm

Fase móvel	Proporção de acetonitrila (%)	Proporção de água (%)
1	40	60
2	50	50
3	55	45
4	60	40
5	64	36
6	68	32
7	70	30
8	72	28
9	76	24
10	80	20

Para estes testes foram utilizadas as seguintes condições experimentais: fluxo 1 ml/min, temperatura do forno da coluna ambiente, volume de injeção 25 µl, comprimento de onda do detector 228 nm. Estas condições iniciais foram baseadas na literatura (GRUMETTO *et al.*, 2008).

A escolha da fase móvel fundamentou-se na comparação entre os picos obtidos, levando-se em consideração o tempo de retenção, a forma e altura do pico, além do gasto de acetonitrila para cada sistema eluente.

Em todo o trabalho a determinação do gasto de acetonitrila foi realizada mediante a seguinte relação algébrica, desenvolvida pelos autores deste trabalho:

$$G = \frac{f \cdot c \cdot t}{100} \quad (1)$$

Em que:

G é o gasto de acetonitrila (ml);

f é o fluxo do eluente utilizado (ml/min);

c é a contribuição percentual de acetonitrila na mistura de eluentes (%);

t é o tempo final do pico do bisfenol A (min).

4.2.1.2 Temperatura do forno da coluna

Foram realizadas corridas nas seguintes condições: fluxo 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água (70:30), volume de injeção 25 µl e comprimento de onda do detector a 228 nm. Neste ensaio se utilizou o sistema fase móvel que apresentou os melhores resultados no teste anterior. Foram testadas três temperaturas para o forno da coluna: 20, 30 e 40 °C. Estes valores foram selecionados considerando a tolerância da coluna à temperatura.

A avaliação da influência da temperatura mais uma vez se baseou na comparação entre os picos obtidos para o bisfenol A, levando-se em consideração o tempo de retenção, a forma e a altura do pico, além do gasto de acetonitrila para cada sistema fase móvel.

4.2.1.3 Comprimento de onda do detector

Foi realizada uma varredura na região do ultravioleta no intervalo entre 190 e 360 nm, faixa de trabalho do detector PDA. A corrida foi desenvolvida nas seguintes condições analíticas: fase móvel acetonitrila-água (70:30), volume de injeção de 25 μ l, fluxo de 1 ml/min, temperatura do forno da coluna de 40 °C (temperatura que apresentou melhores resultados no teste anterior).

4.2.2 Tratamento da amostra

Para cada um dos simulantes de alimento utilizados no trabalho, foi utilizado um método de tratamento prévio à injeção no cromatógrafo. As Figuras 4, 5, 6 e 7 apresentam, respectiva e esquematicamente, os métodos utilizados para os simulantes A (água destilada), B (solução de ácido acético 3%), C (solução de etanol 10%) e D (solução de etanol 95%). A temperatura de 60 °C foi selecionada levando-se em consideração que temperaturas mais baixas experimentadas exigiram tempos de evaporação demasiado elevados, o que comprometia a praticidade do método, bem como o fato de que temperaturas superiores poderiam vir a comprometer a integridade do analito. O tempo de evaporação para cada simulante, por sua vez, foi selecionado como sendo o menor tempo capaz de levar à evaporação total do material. Quanto à adição do bisfenol A, esta foi realizada utilizando volumes variáveis, compatíveis com cada teste.

Figura 4 – Ilustração esquemática apresentando o método de tratamento utilizado para o simulante A (água purificada)

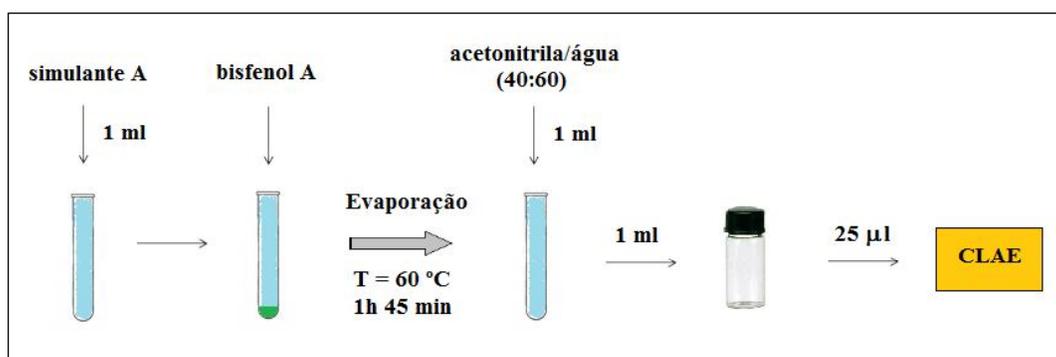


Figura 5 – Ilustração esquemática apresentando o método de tratamento utilizado para o simulante B (solução de ácido acético 3%)

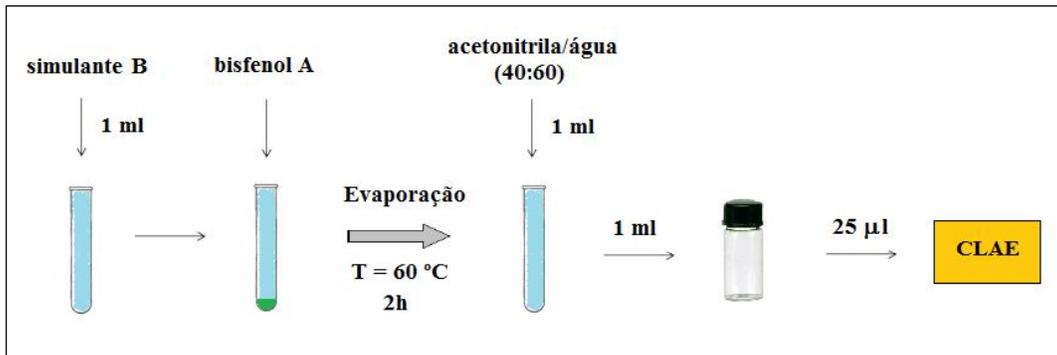


Figura 6 – Ilustração esquemática apresentando o método de tratamento utilizado para o simulante C (solução de etanol 10%)

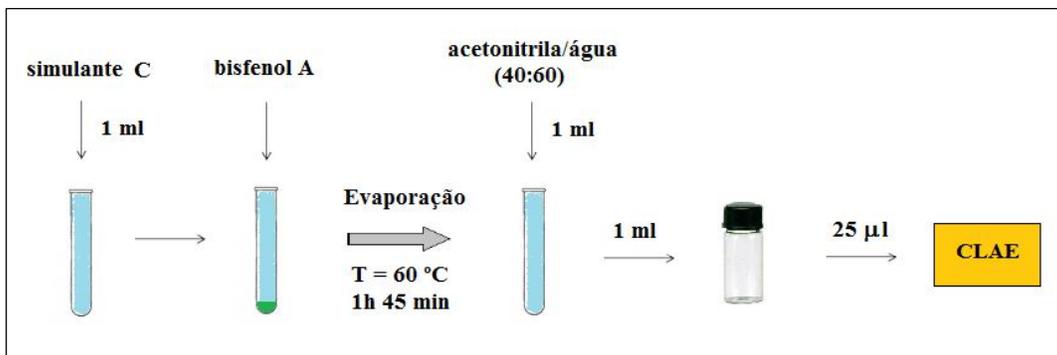
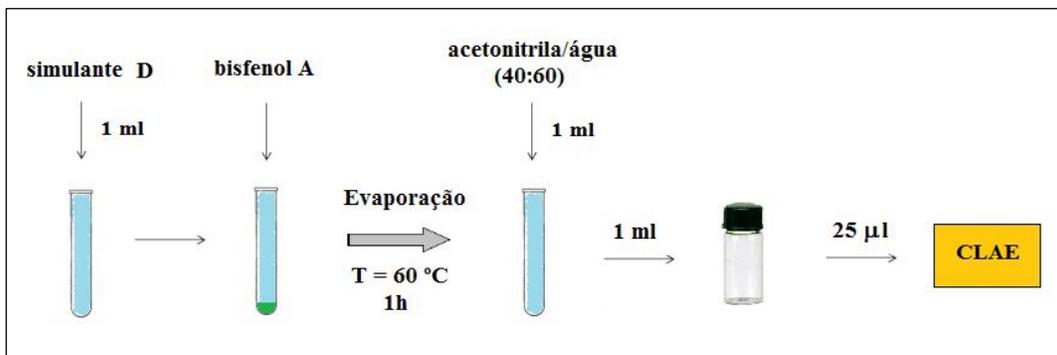


Figura 7 – Ilustração esquemática apresentando o método de tratamento utilizado para o simulante D (solução de etanol 95%)



4.2.3 Validação do método analítico desenvolvido

Foram desenvolvidas três curvas de calibração utilizando as concentrações apresentadas na Tabela 4. A mesma também apresenta a relação percentual entre cada concentração utilizada e o valor central (1000 ppb), representado pelo ponto 4. As concentrações foram selecionadas com base no limite de quantificação citado pela literatura (10 ppb) (YOSHIDA *et al.*, 2001), bem como pelo intervalo de concentração em que o contaminante geralmente é encontrado.

Vale ressaltar que cada ponto foi desenvolvido desde a etapa de tratamento da amostra até sua devida análise cromatográfica.

Tabela 4 – Concentrações de bisfenol A utilizadas nas curvas de calibração e a relação entre as mesmas e o ponto médio em termos percentuais.

Ponto	Concentração de bisfenol A (ng/ml ou ppb)	Percentual relativo ao ponto 4 (%)
1	50	5
2	100	10
3	500	50
4	1000	100
5	1300	130
6	1700	170
7	2000	200

As diferentes concentrações foram obtidas por meio da adição de diferentes volumes das duas soluções de trabalho. A Tabela 5 contém os volumes e a solução utilizada em cada ponto.

As curvas de calibração foram desenvolvidas utilizando as seguintes condições analíticas: fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água (70:30), volume de injeção de 25 µl, temperatura do forno da coluna de 40 °C e comprimento de onda de 201 nm.

Os resultados obtidos para este item foram utilizados para a determinação da linearidade e da estimativa dos limites de detecção e de quantificação do método analítico.

Tabela 5 – Volumes e soluções utilizadas para o preparo dos diferentes pontos de concentração de bisfenol A utilizados nas curvas de calibração (solução de trabalho 1 - 1 µg/ml ou 1 ppm de bisfenol A; solução de trabalho 2 - 10 µg/ml ou 10 ppm de bisfenol A)

Concentração de bisfenol A (ppb)	Volume (µL)	Solução de trabalho
50	50	1
100	100	1
500	50	2
1000	100	2
1300	130	2
1700	170	2
2000	200	2

A **linearidade** foi avaliada a partir da determinação do coeficiente de determinação (r^2), isto é, o quadrado do coeficiente de correlação linear, das curvas de calibração definitivas. Vale ressaltar que não são admitidos valores menores que 0,99 (BRASIL, 2003; INMETRO, 2010).

Realizou-se a estimativa do **limite de detecção** com base na relação do triplo do ruído da linha de base, segundo a equação (BRASIL, 2003):

$$LD = \frac{DP\alpha.3}{IC} \quad (2)$$

Em que:

LD é a estimativa do limite de detecção do método (ppb);

DP α é o desvio padrão do intercepto com o eixo Y;

IC é a inclinação da curva de calibração.

O **limite de quantificação** do método foi estimado mediante a seguinte relação algébrica (BRASIL, 2003):

$$LQ = \frac{DP\alpha.10}{IC} \quad (3)$$

Em que:

LQ é a estimativa do limite de quantificação do método (ppb);

DP α é o desvio padrão do intercepto com o eixo Y;

IC é a inclinação da curva de calibração.

Quanto à **precisão**, foram determinadas a repetibilidade e a precisão intermediária, subdividida ainda em precisão entre analistas diferentes e precisão em dias diferentes. Em ambos os casos a precisão foi obtida matematicamente como o desvio padrão relativo (coeficiente de variação), consoante à fórmula (BRASIL, 2003; INMETRO, 2010):

$$CV = \frac{S.100}{M} \quad (4)$$

Em que:

CV é o coeficiente de variação (%);

S é o desvio padrão entre os valores (ppb);

M é a concentração média determinada (ppb).

Para a determinação da repetibilidade, foram realizadas as análises completas (incluindo tratamento da amostra e análise cromatográfica) de seis amostras diferentes na concentração de 1000 ppb, dentro do mesmo dia. O tratamento da amostra foi realizado de acordo com cada simulante. As condições analíticas utilizadas no ensaio foram: fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água (70:30), volume de injeção de 25 µl, temperatura do forno da coluna de 40 °C e comprimento de onda de 201 nm. O coeficiente de variação (CV) entre as respostas foi determinado.

A determinação da precisão intermediária entre dias diferentes foi realizada por meio de análises completas de seis amostras (1000 ppb), desenvolvidas por um mesmo analista, em três dias distintos. O tratamento da amostra, bem como as condições analíticas foi semelhante ao ensaio para a determinação da repetibilidade. Foi calculada a média entre as respostas obtidas para cada dia e, por fim, determinado o coeficiente de variação (CV) entre esses valores médios.

Para a determinação da precisão intermediária entre analistas diferentes, foram realizadas análises completas de seis amostras diferentes na concentração de 1000 ppb, por três analistas distintos, dentro de um mesmo dia. A metodologia da análise foi semelhante àquela utilizada durante o ensaio de repetibilidade. A média entre as respostas obtidas para cada analista foi calculada e, por fim, determinado o coeficiente de variação (CV) entre esses valores médios.

Para a determinação da **recuperação**, foram realizados ensaios completos, incluindo tratamento da amostra e análise cromatográfica, em triplicata, utilizando três

níveis de concentração: baixa concentração (50 ppb), média concentração (1000 ppb) e alta concentração (2000 ppb), todos em triplicata. Estes valores foram selecionados considerando-se que a recuperação deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para o analito, sendo um teste próximo ao limite de quantificação, um próximo à média da faixa de uso do teste e um terceiro próximo à concentração máxima permitida pelo método. A média entre as respostas obtidas para a mesma concentração foi determinada, sendo considerada a resposta média experimental para aquele nível, além do coeficiente de variação entre as mesmas. Corridas cromatográficas utilizando soluções padrão nestas mesmas concentrações também foram desenvolvidas no mesmo dia das amostras, utilizando as mesmas condições de análise (exceto o tratamento da amostra), estabelecendo assim a resposta teórica para aquele nível (MOREAU, SIQUEIRA, 2008). A recuperação foi obtida mediante a seguinte relação matemática (BRASIL, 2003; INMETRO, 2010):

$$R = \frac{RME.100}{RT} \quad (5)$$

Em que:

R é a recuperação do método (%);

RME é a resposta média experimental;

RT é a resposta teórica.

Para a avaliação da **especificidade** foram realizados ensaios completos, incluindo tratamento da amostra e análise cromatográfica, em triplicata, de amostras sem a adição do bisfenol A. Os cromatogramas obtidos foram analisados para verificar a presença de picos nas regiões próximas ao tempo de retenção observada para o bisfenol A (BRASIL, 2003; INMETRO, 2010; MOREAU, SIQUEIRA, 2008).

Por fim, a **robustez** foi avaliada a partir do desenvolvimento de corridas cromatográficas, em triplicata, primeiramente nas condições estabelecidas como padrão (fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água (70:30), volume de injeção 25 µl, temperatura do forno da coluna de 40 °C e detector UV a 201 nm) e em seguida em condições variadas para mais e para menos (Tabela 6). Em todos os ensaios apenas uma das variáveis foi alterada por vez (BRASIL, 2003).

Tabela 6 – Condições testadas nos ensaios para determinação da robustez (condições padrão: fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água (70:30), volume de injeção de 25 µl, temperatura do forno da coluna de 40 °C e detector UV a 201 nm)

Ensaio	Variável alterada	Condição testada
1	Composição da fase móvel	Acetonitrila-água (69:31)
2	Composição da fase móvel	Acetonitrila-água (71:29)
3	Temperatura do forno da coluna	39 °C
4	Temperatura do forno da coluna	41 °C
5	Comprimento de onda do detector	199 nm
6	Comprimento de onda do detector	203 nm
7	Fluxo da fase móvel	0,9 ml/min
8	Fluxo da fase móvel	1,1 ml/min

Inicialmente foram determinados os valores de tempo de retenção e a resposta (área sob o pico) obtidos para a condição padrão. Em seguida, foram determinadas as relações percentuais entre os resultados obtidos em cada condição testada e aqueles adquiridos na condição padrão. As relações matemáticas 6 e 7 foram utilizadas como meio de cálculo.

$$TRR = \frac{TR \cdot 100}{TRP} \quad (6)$$

Em que:

TRR é o tempo de retenção relativo (%);

TR é tempo de retenção obtido na condição testada;

TRP é o tempo de retenção obtido na condição padrão.

$$RR = \frac{R \cdot 100}{RP} \quad (7)$$

Em que:

RR é a resposta relativa (%);

R é a resposta obtida na condição testada;

RP é a resposta obtida na condição padrão.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação preliminar das condições de análise

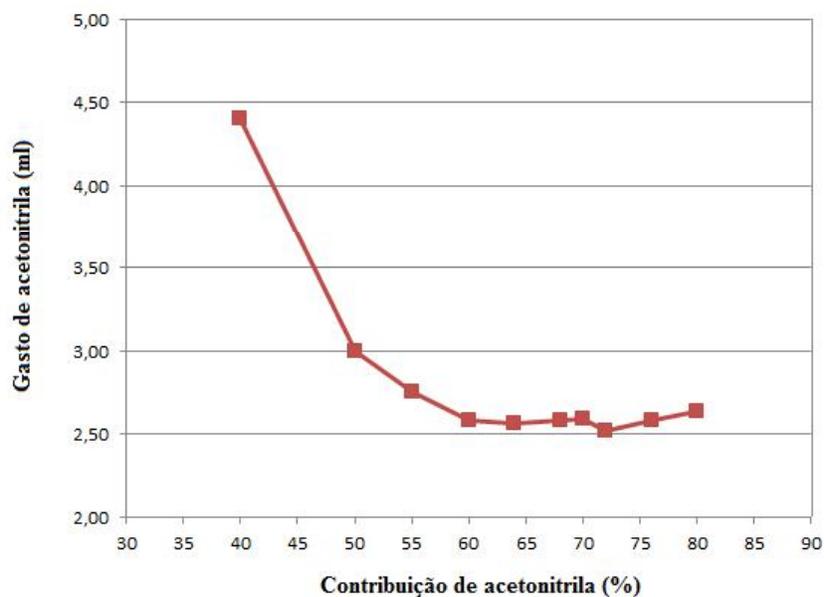
5.1.1 Sistema fase móvel

A Tabela 7 resume o gasto de acetonitrila calculado para cada sistema fase móvel testado. Estes valores foram plotados na forma de gráfico, representado pela Figura 8.

Tabela 7 – Gasto de acetonitrila segundo fase móvel testada

Fase Móvel	Fluxo (ml/min)	Acetonitrila (%)	Tempo final do pico (min)	Gasto (ml)
1	1	40	11,0	4,40
2	1	50	6,0	3,00
3	1	55	5,0	2,75
4	1	60	4,3	2,58
5	1	64	4,0	2,56
6	1	68	3,8	2,58
7	1	70	3,7	2,59
8	1	72	3,5	2,52
9	1	76	3,4	2,58
10	1	80	3,3	2,64

Figura 8 – Gráfico da relação entre gasto de acetonitrila e contribuição percentual de acetonitrila na fase móvel. Condições de análise: eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, temperatura ambiente do forno da coluna, volume de injeção de 25 µl e comprimento de onda do detector 228 nm



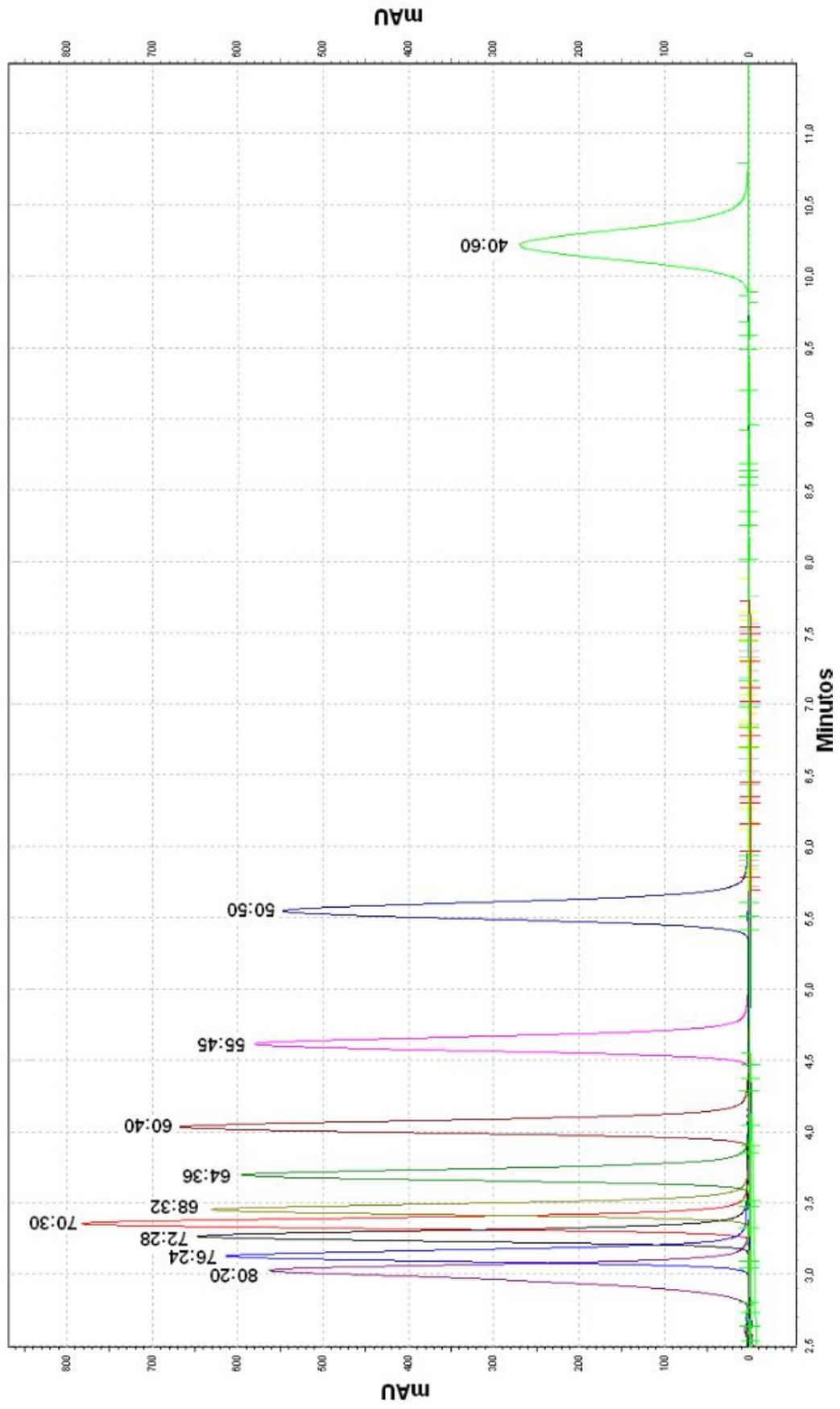
O gasto de acetonitrila (G) diminui gradativamente com o aumento da concentração de acetonitrila até 60 %. Isso pode ser explicado pelo fato de que o tempo final do pico do bisfenol A (t) diminui mais intensamente que a contribuição percentual de acetonitrila na mistura de eluentes (c) aumenta, sendo que o produto $t \times c$ diminui (Equação 1, página 38). A partir de 60 % de acetonitrila, o gasto de acetonitrila (G) se manteve relativamente constante, possivelmente devido a uma maior interação entre a fase móvel e a fase estacionária do sistema cromatográfico de fase reversa, favorecendo uma menor retenção do bisfenol A no sistema, diminuindo o seu tempo de retenção e o tempo final do pico (t).

A Figura 9 agrupa os cromatogramas obtidos para cada sistema fase móvel testado.

A análise da Figura 9 esclarece que o sistema acetonitrila-água (70:30 v/v) apresentou a resposta mais intensa (maior sensibilidade), quando comparado aos outros sistemas avaliados, atingindo valores superiores a 780 mAU. Notou-se também uma gradativa diminuição do tempo de retenção para o bisfenol A à medida que a contribuição de acetonitrila aumentava.

Os resultados obtidos entram em acordo com o triângulo de seletividade de fases móveis para CLAE-fase reversa, que afirma que a seletividade pode ser obtida mediante utilização de um dentre três solventes de seletividade diferente (metanol, tetraidrofurano e acetonitrila), utilizando-se a água para ajustar a força cromatográfica da mistura (COLLINS, BRAGA, BONATO, 2006).

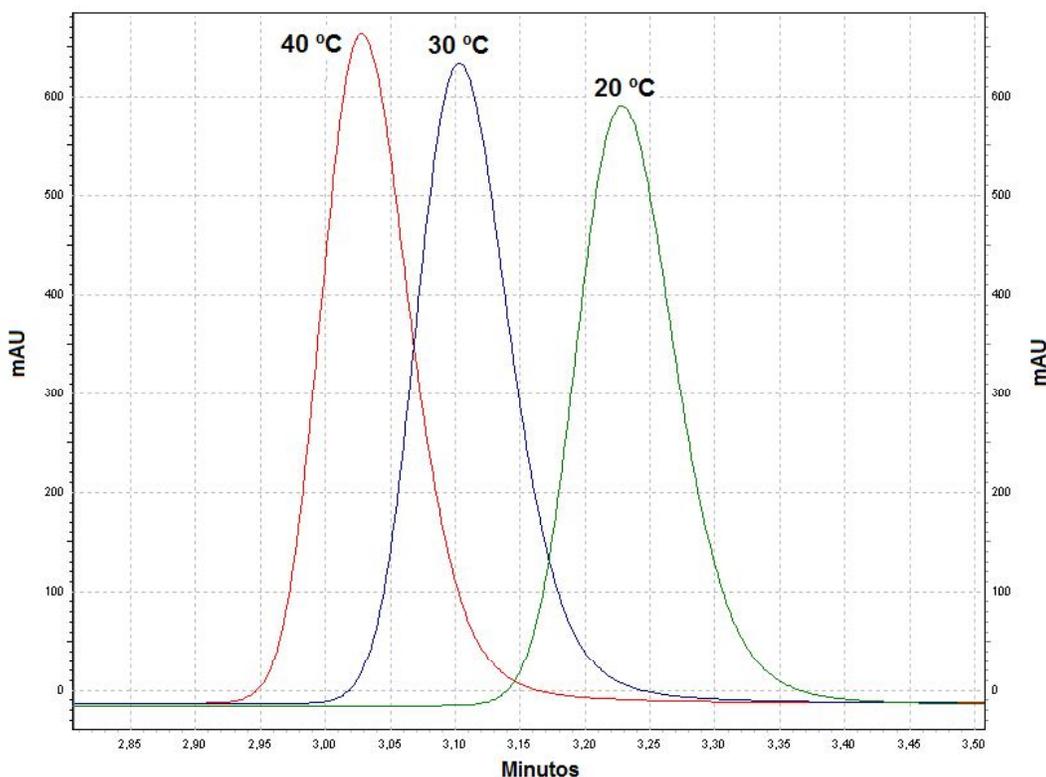
Figura 9 – Cromatogramas obtidos utilizando fases móveis com diferentes proporções acetonitrila:água (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, temperatura ambiente de forno de coluna, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm, detecção a 228 nm)



5.1.2 Temperatura do forno da coluna

A Figura 10 ilustra os cromatogramas obtidos neste ensaio.

Figura 10 – Cromatogramas obtidos utilizando diferentes temperaturas no forno da coluna (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetoneitrila-água 70:30 em condição isocrática, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm, detecção a 228 nm)



O gasto de acetoneitrila calculado para cada temperatura está apresentado na Tabela 8. A Figura 11 apresenta os valores na forma de gráfico.

Tabela 8 – Gasto de acetoneitrila segundo temperatura do forno da coluna

Temperatura (°C)	Fluxo (ml/min)	Acetoneitrila (%)	Tempo pico (min)	Gasto (ml)
20	1	70	3,4	2,38
30	1	70	3,3	2,31
40	1	70	3,2	2,24

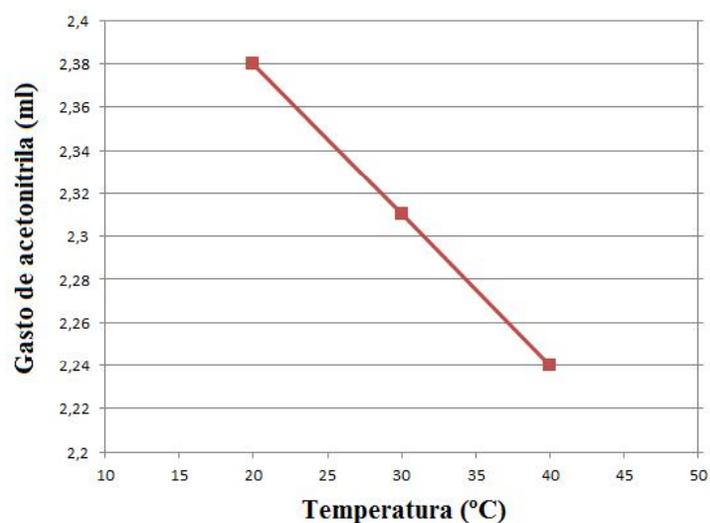
Observou-se que com o aumento da temperatura do forno da coluna houve um incremento na intensidade da resposta (altura do pico) para o bisfenol A, bem como uma diminuição do tempo de retenção do mesmo.

O gasto de acetonitrila, por sua vez, apresentou queda gradativa com o aumento da temperatura da coluna. Destarte, a temperatura excelente de 40 °C coincide com aquela citada na literatura (KANG & KONDO, 2002).

Não existe regra para explicar a influência da temperatura da coluna em separação por CLAE, entretanto frequentemente o aumento da temperatura é acompanhado pelo aumento do desempenho da separação. A explicação para este fenômeno estaria na diminuição da viscosidade da fase móvel, o que melhora a transferência de massa. Quanto ao fator de retenção, é possível ocorrer tanto diminuição como aumento com o incremento da temperatura (COLLINS, BRAGA, BONATO, 2006).

Segundo Collins, Braga e Bonato (2006), o controle da temperatura da coluna oferece uma melhor repetibilidade ao método cromatográfico, e para a otimização de qualquer separação cromatográfica, a influência da temperatura deve ser verificada.

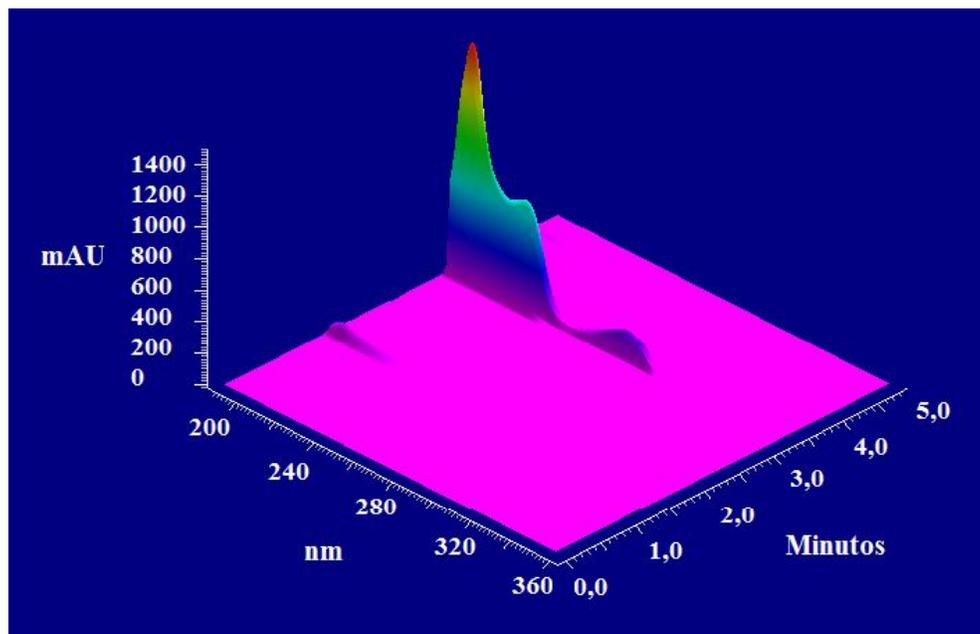
Figura 11 – Gráfico da relação entre o gasto de acetonitrila e a temperatura do forno da coluna. Condições de análise: eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30, volume de injeção de 25 µl e comprimento de onda do detector 228 nm



5.1.3 Comprimento de onda do detector

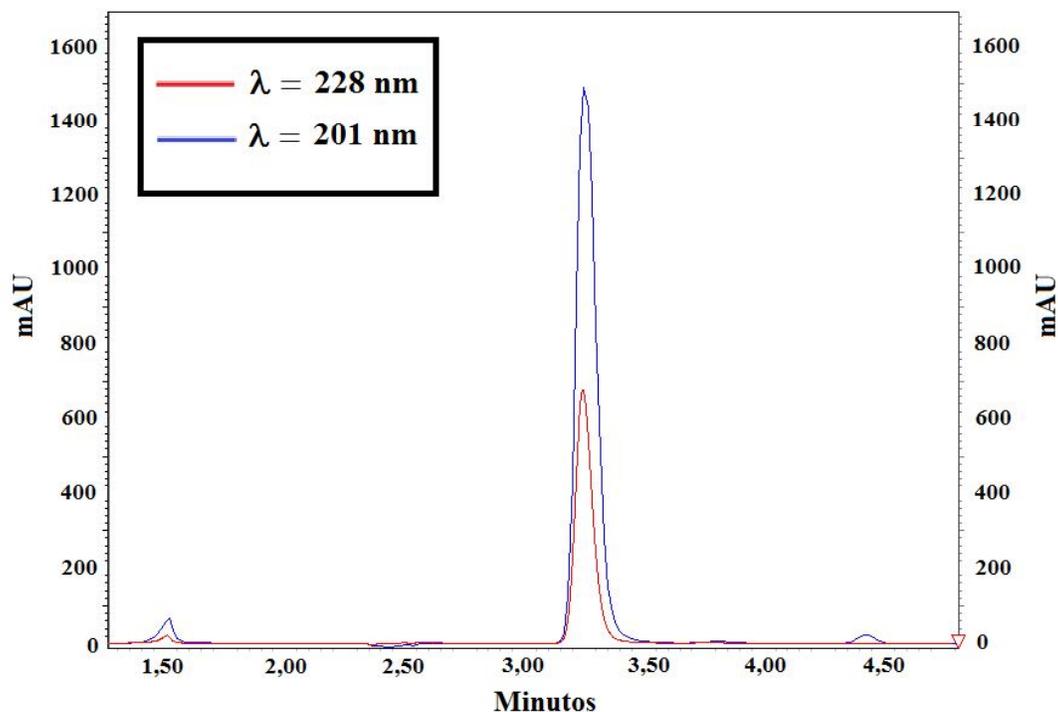
A Figura 12 apresenta o espectro tridimensional (espectrograma) obtido no ensaio. Neste espectro estão explícitas as relações entre comprimento de onda, tempo de retenção e intensidade da resposta. Enquanto a Figura 13 compara os cromatogramas obtidos nos comprimentos de onda 228 nm, citado pela literatura (GRUMETTO *et al.*, 2008) e 201 nm (aquele cuja resposta foi a mais intensa neste ensaio).

Figura 12 – Espectrograma relacionando tempo de retenção, intensidade da resposta e comprimento de onda (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)



Observou-se a presença de um total de três picos de absorção para o bisfenol A. O primeiro deles, o mais intenso de todos, em aproximadamente 201 nm. O segundo pico, de intensidade aproximadamente na terça parte do primeiro, em 228 nm, enquanto o terceiro na faixa de 270 nm, menor em intensidade quando comparado aos dois primeiros.

Figura 13 – Cromatogramas obtidos nos comprimentos de onda de 228 e 201 nm (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)



Vale citar que o conhecimento do espectro de absorvância de um composto químico presente na amostra permite selecionar o comprimento de onda de absorvância máxima, o que melhora a detectabilidade e permite a eliminação de picos interferentes (COLLINS, BRAGA, BONATO, 2006).

O tempo de retenção do bisfenol A se situou em 3,25 minutos, quando determinado nas condições de análise consideradas excelentes neste trabalho.

5.2 Simulante A

As Figuras 14, 15 e 16 apresentam, respectivamente, as três curvas de calibração obtidas para o simulante A, além das equações da reta e coeficientes de determinação linear (r^2).

Figura 14 – Primeira curva de calibração para o simulante A (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, comprimento de onda do detector 201 nm, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)

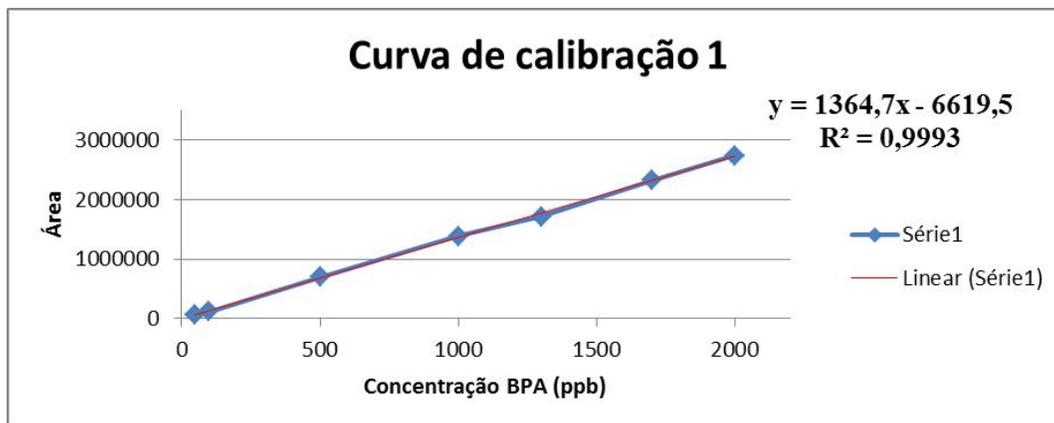


Figura 15 – Segunda curva de calibração para o simulante A (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, comprimento de onda do detector 201 nm, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)

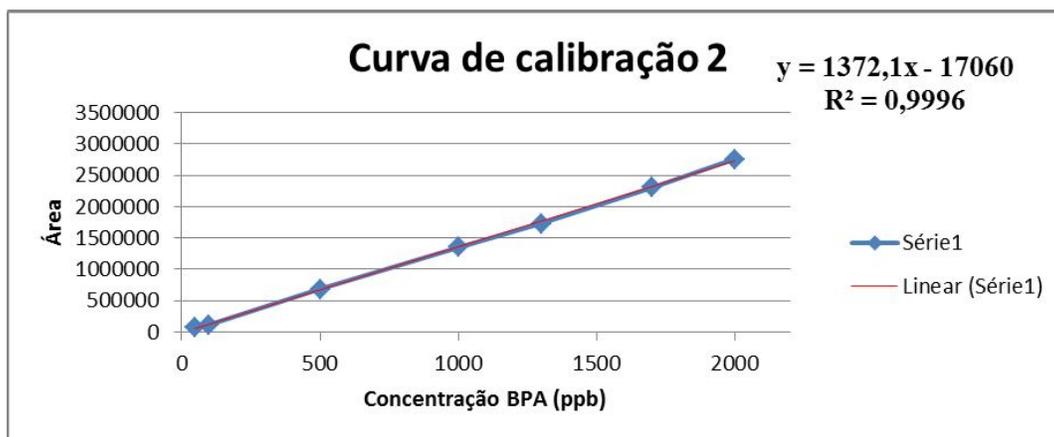
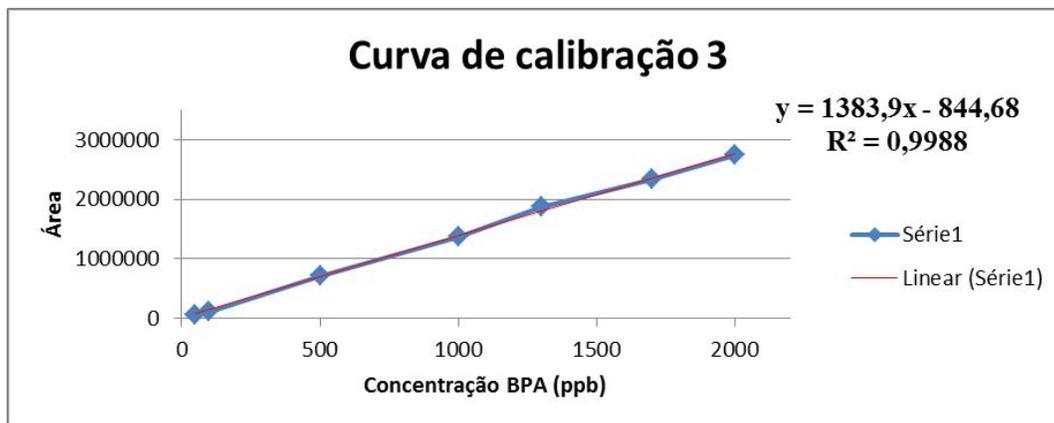


Figura 16 – Terceira curva de calibração para o simulante A (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, comprimento de onda do detector 201 nm, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)



Os resultados mostraram uma linearidade excelente para o método testado, no intervalo de concentração do analito entre 50 e 2000 ppb, uma vez que todos os valores de r^2 apresentaram-se acima do exigido (0,99) e recomendado pelos guias de validação utilizados (BRASIL, 2003; INMETRO, 2010).

Considerando os valores de IC médio e DP α das curvas de calibração, utilizando-se a equação 2, obteve-se o valor do limite de detecção (LD) do método: 14,7 ppb. O valor obtido para a estimativa do limite de quantificação (LQ) foi de 48,9 ppb.

Os resultados obtidos para estes parâmetros analíticos são compatíveis com aqueles constantes na literatura (LD = 20,0 ppb e LQ = 66,9 ppb), obtidos na análise de bisfenol A em alimentos, sugerindo que o método apresenta a sensibilidade exigida para a finalidade a qual é proposta (GRUMETTO *et al.*, 2008).

A Tabela 9 apresenta os valores obtidos para a área sob a curva relativos aos ensaios de repetibilidade, além do valor médio, desvio padrão e coeficiente de variação (CV).

O método apresentou excelente repetibilidade, o que pode ser evidenciado pelo baixo valor do desvio padrão relativo (ou coeficiente de variação): 2,07%. Este valor aproxima-se daqueles citados na literatura, que se encontram entre 0,04% e 1,84% (GRUMETTO *et al.*, 2008).

Vale ressaltar que a recomendação vigente é que este valor não supere a marca de 5% (BRASIL, 2003).

Tabela 9 – Resultados do ensaio de repetibilidade para o simulante A (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, comprimento de onda do detector 201 nm, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)

Repetição	Área sob a curva
1	1382599
2	1356008
3	1305221
4	1333452
5	1363734
6	1328253
Média	1344877,8
Desvio padrão	27863,7
CV (%)	2,07

A Tabela 10 apresenta os resultados médios das repetições realizadas nos ensaios para a determinação da precisão intermediária entre dias diferentes, bem como desvio padrão e coeficiente de variação (CV) entre os mesmos. Os valores individuais obtidos para cada corrida encontram-se no Apêndice A.

Tabela 10 – Resultados do ensaio de precisão realizado em dias diferentes pelo mesmo analista para o simulante A (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)

Dia de análise	Resposta média
1	1399534
2	1378938
3	1401018
Média	1393163
Desvio Padrão	14562,98
CV (%)	1,05

A Tabela 11 apresenta os resultados médios, desvio padrão e coeficiente de variação (CV) referentes aos ensaios para a determinação da precisão intermediária

entre analistas diferentes. Os valores individuais obtidos para cada corrida encontram-se no Apêndice A.

Tabela 11 – Resultados do ensaio de precisão realizado em um mesmo dia por analistas diferentes para o simulante A (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, comprimento de onda do detector 201 nm, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)

Analista	Resposta média
1	1378938,333
2	1344877,833
3	1372501,5
Média	1365439,222
Desvio Padrão	24084,41052
CV (%)	1,76

A partir dos valores de CV obtidos, pode-se observar que o método apresentou ótima precisão intermediária em todas as condições testadas, variando entre 1,05% e 1,76%. Todos os resultados de coeficiente de variação determinados encontram-se abaixo do valor mais elevado citado pela literatura (2,20%) (GRUMETTO *et al.*, 2008). Todos os valores se encontram abaixo daquele estabelecido pela ANVISA (5%) (BRASIL, 2003).

Os resultados relacionados ao ensaio de recuperação em baixa (50 ppb), média (1000 ppb) e alta concentração (2000 ppb) estão apresentados, nas Tabelas 12, 13 e 14, respectivamente.

A partir desses valores foi determinada a recuperação do método em baixa, média e alta concentração, respectivamente: 97,9% (CV= 1,3%), 99,2% (CV= 0,7%) e 103,6% (CV= 0,4%). Estes valores comprovam que o método desenvolvido apresenta uma recuperação próxima do ideal (100%).

A Figura 17 apresenta o cromatograma obtido no ensaio para avaliação da especificidade do método desenvolvido para o simulante A. Para melhor avaliação foi adicionado à figura o cromatograma típico obtido na presença do bisfenol (1000 ppb).

Pode-se observar a ausência de picos na região adjacente a 3,25 minutos dos cromatogramas, o que comprova a ausência de compostos que pudessem interferir na identificação e quantificação do bisfenol A.

Tabela 12 – Resultado para a recuperação em baixa concentração (50 ppb) de bisfenol A no simulante A (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, comprimento de onda do detector 201 nm, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)

Corrida	Concentração (ppb)	Recuperação (%)
Condição padrão	50,00	100,0
1	48,88	97,8
2	49,58	99,2
3	48,35	96,7
Média	48,94	97,9
CV (%)	1,3	1,3

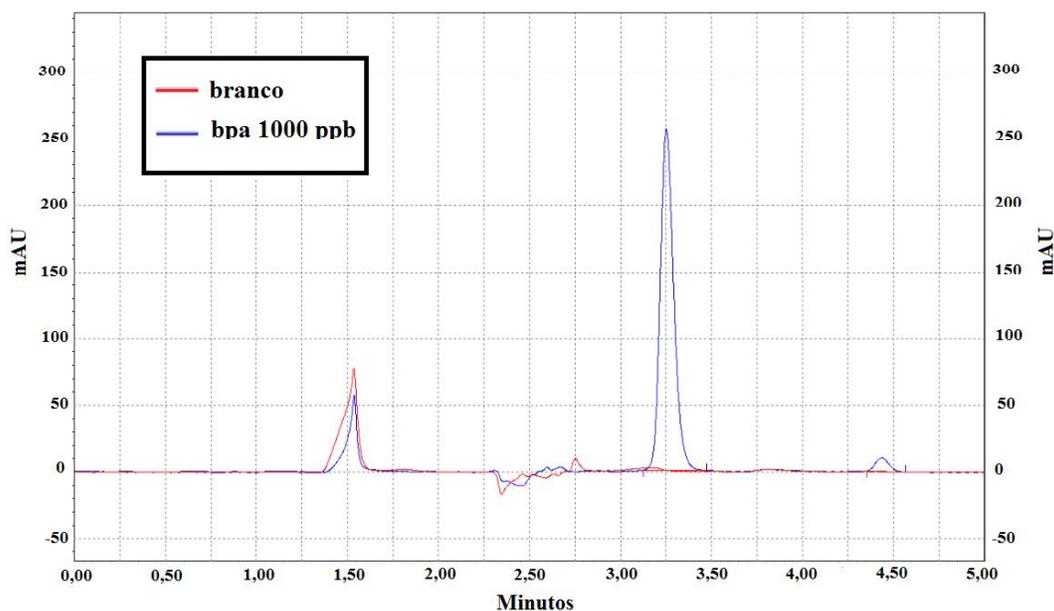
Tabela 13 – Resultado para a recuperação em média concentração (1000 ppb) para o simulante A (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, comprimento de onda do detector 201 nm, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)

Corrida	Concentração (ppb)	Recuperação (%)
Condição padrão	1000	100,0
1	989,79	99,0
2	999,44	99,9
3	985,42	98,5
Média	991,55	99,2
CV (%)	0,7	0,7

Tabela 14 – Resultados para o ensaio de recuperação em alta concentração (2000 ppb) para o simulante A (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, comprimento de onda do detector 201 nm, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)

Corrida	Concentração (ppb)	Recuperação (%)
Condição padrão	2000	100,0
1	2067,76	103,4
2	2080,79	104,0
3	2067,66	103,4
Média	2072,07	103,6
CV (%)	0,4	0,4

Figura 17 – Cromatograma obtido no ensaio utilizado para avaliação da especificidade do método desenvolvido para o simulante A, e cromatograma típico do bisfenol A 1000 ppb (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, comprimento de onda do detector 201 nm, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)



A Tabela 15 apresenta os resultados obtidos para o ensaio de robustez para o método desenvolvido.

Pode-se verificar que a variação do fluxo da fase móvel foi aquela que interferiu com maior intensidade no valor do tempo de retenção. Na condição de 0,9 ml/min foi obtido o maior valor (3,61 minutos, que representa 111,5 % daquele em condição padrão), enquanto para fluxo de 1,1 ml/min o bisfenol eluiu no menor tempo (2,94 minutos, que representa 90,9 % do padrão). Estes valores permanecem, no entanto, dentro de um limite aceitável, principalmente quando se leva em consideração que a variação utilizada na condição também foi intensa (± 10 %).

Com relação ao valor da intensidade da resposta, pode-se constatar que a variação no comprimento de onda utilizado pelo detector foi a que mais interferiu, sendo o maior valor (1557166,7, que representa 112,5 % daquele em condição padrão) referente a 199 nm, enquanto o menor (1147385,2, representando 82,9 % do padrão) foi obtido a 203 nm. Estes resultados estão de acordo com o próprio espectro do bisfenol A (Figura 12).

Tabela 15 – Resultados obtidos para o ensaio de robustez do método desenvolvido para o simulante A, onde TR é o tempo de retenção, TRR é o tempo de retenção relativo ao padrão, R é a resposta obtida na condição testada e RR é a resposta relativa ao padrão (condições padrão: fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água (70:30), volume de injeção 25 μ l, temperatura do forno da coluna a 40 °C e detector UV a 201 nm)

Condição	TR (min)	TRR (%)	R	RR (%)
Padrão	3,24	100,0	1383550,0	100,0
Fase móvel (69:31)	3,27	101,2	1379291,3	99,7
Fase móvel (71:29)	3,19	98,7	1389529,7	100,4
Temperatura coluna 39 °C	3,24	100,2	1365462,2	98,7
Temperatura coluna 41 °C	3,22	99,6	1360267,8	98,3
Comprimento de onda 199 nm	3,23	99,8	1557166,7	112,5
Comprimento de onda 203 nm	3,24	100,1	1147385,2	82,9
Fluxo 0,9 ml/min	3,61	111,5	1528189,3	110,5
Fluxo 1,1 ml/min	2,94	90,9	1249749,0	90,3

5.3 Simulante B

As curvas de calibração obtidas para o simulante B, além das equações da reta e coeficientes de correlação linear (r^2) estão contidas nas Figuras 18, 19 e 20.

Figura 18 – Primeira curva de calibração para o simulante B (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, comprimento de onda do detector 201 nm, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)

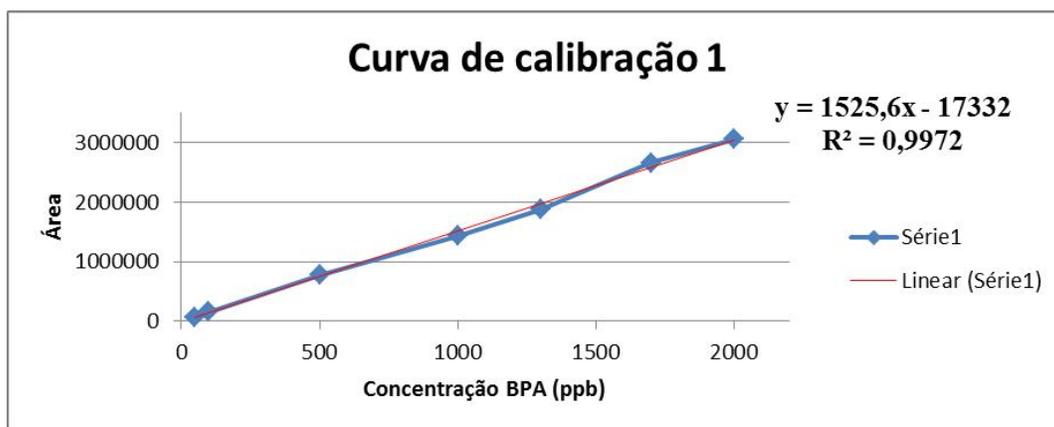


Figura 19 – Segunda curva de calibração para o simulante B (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, comprimento de onda do detector 201 nm, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)

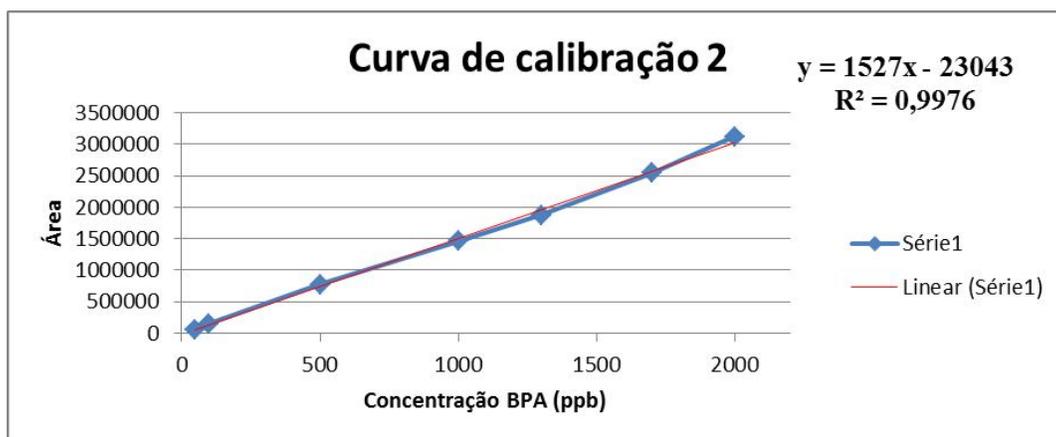
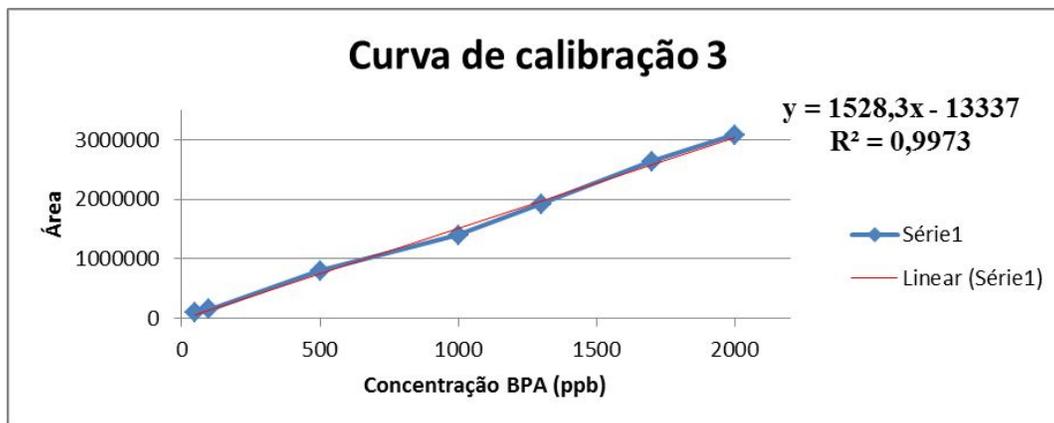


Figura 20 – Terceira curva de calibração para o simulante B (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, comprimento de onda do detector 201 nm, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)



O método desenvolvido para o simulante B apresentou linearidade no intervalo de 50 a 2000 ppb, o que pode ser evidenciado pelo fato de que todos os valores de r^2 apresentaram-se superiores ao mínimo exigido (0,99) pelos guias de validação utilizados (BRASIL, 2003; INMETRO, 2010).

A estimativa do limite de detecção (LD) do método foi de 7,8 ppb, enquanto para o limite de quantificação (LQ) ficou em 26 ppb. Destarte, o método mostrou sensibilidade adequada para a finalidade proposta.

A Tabela 16 apresenta os resultados referentes ao ensaio de repetibilidade, incluindo o valor médio, desvio padrão e o coeficiente de variação (CV).

Os resultados (3,74%) atestam boa repetibilidade para o método testado, estando dentro dos limites legais (5%) (BRASIL, 2003).

A Tabela 17 apresenta os resultados dos ensaios para a determinação da precisão intermediária entre dias diferentes, bem como desvio padrão e coeficiente de variação (CV) entre os mesmos. Os valores individuais obtidos para cada corrida, por sua vez, estão inseridos no Apêndice B.

Os resultados referentes aos ensaios para a determinação da precisão intermediária entre analistas diferentes encontram-se na Tabela 18. Os valores individuais obtidos para cada corrida encontram-se no Apêndice B.

Tabela 16 – Resultados do ensaio de repetibilidade para o simulante B (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, comprimento de onda do detector 201 nm, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)

Repetição	Área sob a curva
1	1304921
2	1214741
3	1286128
4	1287281
5	1344778
6	1346663
Média	1297418,7
Desvio padrão	48559,3
CV (%)	3,74

Tabela 17 – Resultados do ensaio de precisão realizado em dias diferentes pelo mesmo analista para o simulante B (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, comprimento de onda do detector 201 nm, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)

Dia de análise	Resposta média
1	1325959,8
2	1323336,7
3	1354943
Média	1334746,5
Desvio Padrão	1854,9
CV (%)	0,14

Tabela 18 – Resultados do ensaio de precisão realizado em um mesmo dia por analistas diferentes para o simulante B (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, comprimento de onda do detector 201 nm, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)

Analista	Resposta média
1	1323336,7
2	1327117,5
3	1297418,7
Média	1315957,6
Desvio Padrão	2673,4
CV (%)	0,20

Todos os resultados de coeficiente de variação determinados no ensaio de precisão intermediária encontram-se abaixo do valor mais elevado citado pela literatura (2,20%). Um dos valores, inclusive, coincidiu exatamente com aquele encontrado por Grumeto *et al.* (2008): 0,14%. Todos os valores se encontram abaixo daquele estabelecido pela Anvisa (5%) (BRASIL, 2003).

As Tabelas 19, 20 e 21 apresentam os resultados relacionados ao ensaio de recuperação em baixa (50 ppb), média (1000 ppb) e alta concentração (2000 ppb).

A recuperação do método em baixa, média e alta concentração, foi determinada como, respectivamente: 94,8% (CV= 4,8%), 99,8% (CV= 0,2%) e 92,3% (CV= 1,8%). Dessa maneira, constatou-se que o método desenvolvido apresentou boa recuperação.

A Figura 21 apresenta o cromatograma obtido no teste de especificidade do método desenvolvido para o simulante B. O cromatograma obtido na presença do bisfenol (1000 ppb) foi novamente adicionado.

Não foram observados picos importantes na região adjacente a 3,25 minutos dos cromatogramas, o que comprova a ausência de interferentes na investigação analítica do bisfenol A.

Tabela 19 – Resultados para o ensaio de recuperação em baixa concentração (50 ppb) para o simulante B (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, comprimento de onda do detector 201 nm, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)

Corrida	Concentração (ppb)	Recuperação (%)
Condição padrão	50	100
1	44,88	89,8
2	47,98	96,0
3	49,32	98,6
Média	47,39	94,8
CV (%)	4,8	4,8

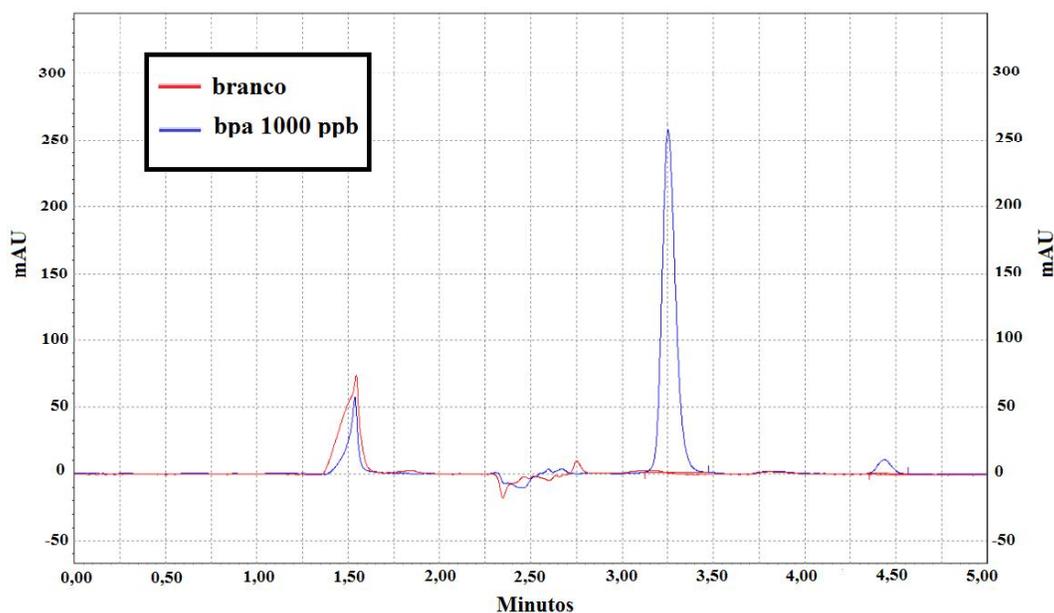
Tabela 20 – Resultados para o ensaio de recuperação em média concentração (1000 ppb) para o simulante B (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, comprimento de onda do detector 201 nm, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)

Corrida	Concentração (ppb)	Recuperação (%)
Condição padrão	1000	100
1	997,35	99,7
2	1001,28	100,1
3	996,64	99,7
Média	998,43	99,8
CV (%)	2,5	2,5

Tabela 21 – Resultados para o ensaio de recuperação em alta concentração (2000 ppb) para o simulante B (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, comprimento de onda do detector 201 nm, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)

Corrida	Concentração (ppb)	Recuperação (%)
Condição padrão	2000	100
1	1850,51	92,5
2	1809,78	90,5
3	1877,65	93,9
Média	1845,98	92,3
CV (%)	1,8	1,8

Figura 21 – Cromatograma obtido no ensaio utilizado para avaliação da especificidade do método desenvolvido para o simulante B, e cromatograma típico do bisfenol A 1000 ppb (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, comprimento de onda do detector 201 nm, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)



A Tabela 22 apresenta os resultados obtidos para o ensaio de robustez para o método desenvolvido.

Tabela 22 – Resultados obtidos para o ensaio de robustez do método desenvolvido para o simulante B, onde TR é o tempo de retenção, TRR é o tempo de retenção relativo ao padrão, R é a resposta obtida na condição testada e RR é a resposta relativa ao padrão (condições padrão: fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água (70:30), volume de injeção 25 µl, temperatura do forno da coluna a 40 °C e detector UV a 201 nm)

Condição	TR (min)	TRR (%)	R	RR (%)
Padrão	3,25	100	1054940	100
Fase móvel (69:31)	3,29	101,2	1114315,7	105,6
Fase móvel (71:29)	3,22	98,9	1124600,0	106,6
Temperatura coluna 39 °C	3,26	100,3	1078739,7	102,3
Temperatura coluna 41 °C	3,25	99,7	998087,7	94,6
Comprimento de onda 199 nm	2,92	89,7	1195972,3	113,4
Comprimento de onda 203 nm	3,25	99,9	829723,7	78,7
Fluxo 0,9 ml/min	3,63	111,6	1228294,3	116,4
Fluxo 1,1 ml/min	2,96	90,9	1007243,3	95,5

Mais uma vez, a variação no fluxo da fase móvel interferiu com maior intensidade no valor do tempo de retenção. O maior valor (3,63 minutos, que representa 111,6 % daquele em condição padrão) foi aquele obtido com fluxo de 0,9 ml/min, enquanto para fluxo de 1,1 ml/min, o bisfenol foi detectado no menor tempo (2,96 minutos, que representa 90,9 % do padrão).

Com relação ao valor da intensidade da resposta os resultados também coincidiram com aqueles obtidos para o simulante A: a variação no comprimento de onda utilizado pelo detector foi aquela de maior interferência, sendo o maior valor (1195972,3, que representa 113,4 % do padrão) obtido a 199 nm, enquanto o menor (829723,7, representando 78,7 % do padrão) foi obtido a 203 nm.

5.4 Simulante C

As Figuras 22, 23 e 24 apresentam as curvas de calibração obtidas para o simulante C.

Figura 22 – Primeira curva de calibração para o simulante C (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, comprimento de onda do detector 201 nm, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)

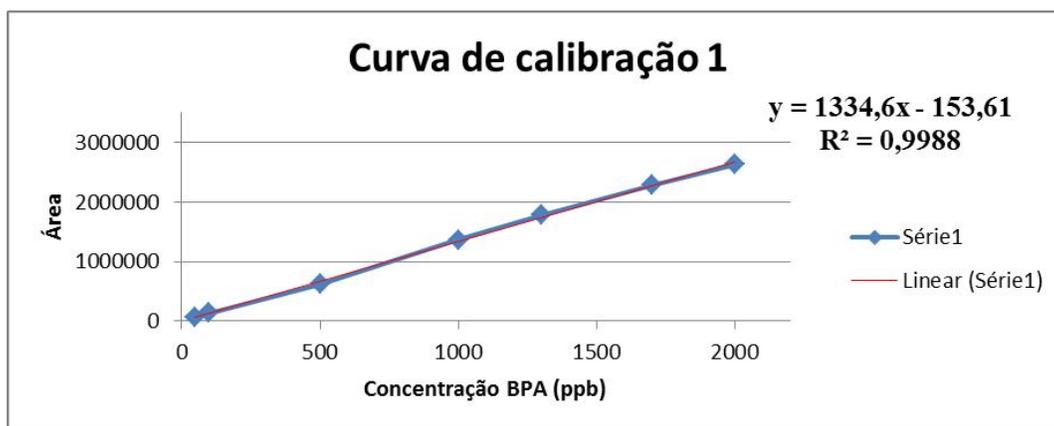


Figura 23 – Segunda curva de calibração para o simulante C (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, comprimento de onda do detector 201 nm, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)

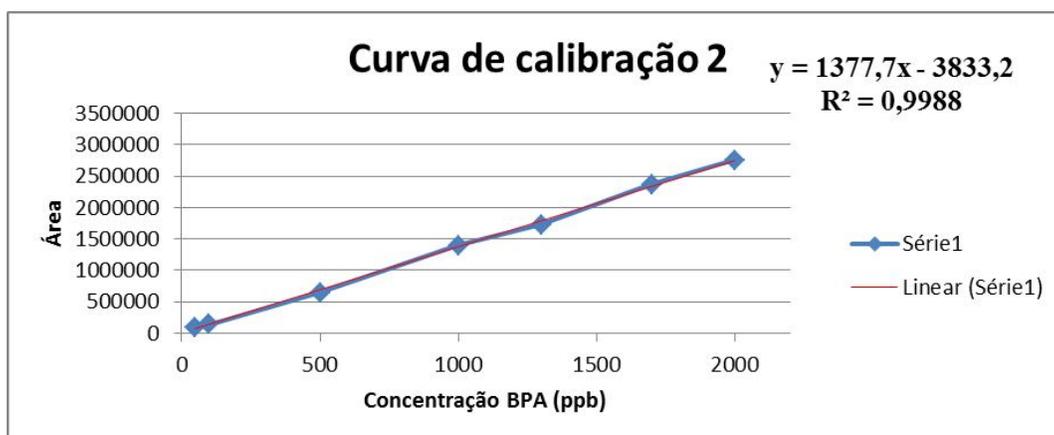
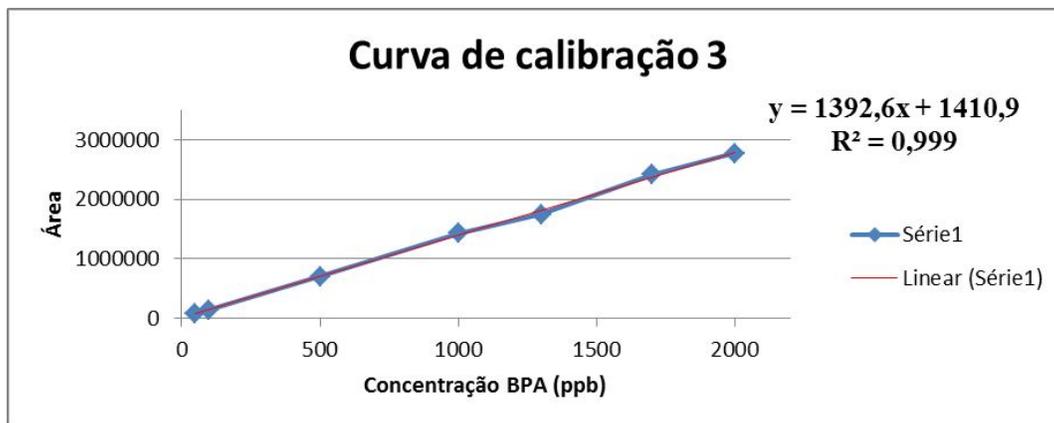


Figura 24 – Terceira curva de calibração para o simulante C (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, comprimento de onda do detector 201 nm, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)



O método desenvolvido para o simulante C mostrou-se linear no intervalo de 50 a 2000 ppb para o bisfenol A, fato constatado pelos valores obtidos para coeficiente de determinação, todos superiores ao mínimo exigido (0,99) pelos guias de validação utilizados (BRASIL, 2003; INMETRO, 2010).

O valor do LD para o método foi estimado em 4,8 ppb. O limite de quantificação, por sua vez, ficou estabelecido em 16,1 ppb. A partir destes resultados podemos considerar o método sensível e adequado, neste quesito, para a finalidade a qual é proposto.

A Tabela 23 apresenta os resultados referentes ao ensaio de repetibilidade, relacionados ao método desenvolvido para o simulante C.

Os resultados (2,84%) atestam boa repetibilidade para o método testado, estando dentro dos limites legais (5%) (BRASIL, 2003).

Os resultados relacionados à precisão intermediária entre dias diferentes obtidos para o simulante C estão contidos na Tabela 24. Os valores individuais obtidos para cada corrida, por sua vez, estão inseridos no Apêndice C.

Os resultados referentes aos ensaios para a determinação da precisão intermediária entre analistas diferentes encontram-se na Tabela 25. Os valores individuais obtidos para cada corrida encontram-se no Apêndice C.

Tabela 23 – Resultados do ensaio de repetibilidade para o simulante C (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, comprimento de onda do detector 201 nm, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)

Repetição	Área sob a curva
1	1513997
2	1460611
3	1552011
4	1487826
5	1503419
6	1430868
Média	1491455,3
Desvio padrão	42316,9
CV (%)	2,84

Tabela 24 – Resultados obtidos para o ensaio de precisão realizado em dias diferentes pelo mesmo analista para o simulante C (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, comprimento de onda do detector 201 nm, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)

Dia de análise	Resposta média
1	1306893,2
2	1332524,2
3	1340431
Média	1326616,1
Desvio Padrão	18123,8
CV (%)	1,37

Tabela 25 – Resultados para o ensaio de precisão realizado em um mesmo dia por analistas diferentes para o simulante C (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, comprimento de onda do detector 201 nm, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)

Analista	Resposta média
1	1332524,2
2	1329973,7
3	1302112,2
Média	1321536,7
Desvio Padrão	1803,5
CV (%)	0,14

Todos os resultados de coeficiente de variação determinados para a precisão intermediária encontram-se abaixo do valor mais elevado citado pela literatura (2,20%). Um dos resultados (coeficiente de variação obtido para precisão intermediária por analistas diferentes em um mesmo dia) coincidiu exatamente com aquele citado por Grumeto *et al.* (2008) (0,14%). É importante lembrar que os valores obtidos para CV na avaliação da precisão do método analítico para o simulante C se encontram abaixo do limite determinado (5%) (BRASIL, 2003).

Quanto aos resultados referentes à avaliação da recuperação do método, se encontram todos reunidos nas Tabelas 26, 27 e 28. A recuperação do método em baixa, média e alta concentração, foi determinada como, respetivamente: 104,6% (CV= 2,5%), 99,8% (CV= 1,3%) e 102,5% (CV= 2,9%). A partir destes resultados pode-se considerar que o método desenvolvido apresentou boa recuperação nos três níveis de concentração testados.

O cromatograma obtido na avaliação da especificidade do método desenvolvido para o simulante C se apresenta na Figura 25, bem como o cromatograma obtido para o bisfenol a 1000 ppb.

Pode-se observar facilmente, nos cromatogramas apresentados, a ausência de picos na região adjacente a 3,25 minutos, região esta onde o pico do analito se apresenta. A partir desta constatação podemos confirmar a especificidade do método desenvolvido.

Tabela 26 – Resultados para o ensaio de recuperação em baixa concentração (50 ppb) para o simulante C (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, comprimento de onda do detector 201 nm, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)

Corrida	Concentração (ppb)	Recuperação (%)
Condição padrão	50,00	100,0
1	50,99	102,0
2	52,28	104,6
3	53,60	107,2
Média	52,29	104,6
CV (%)	2,5	2,5

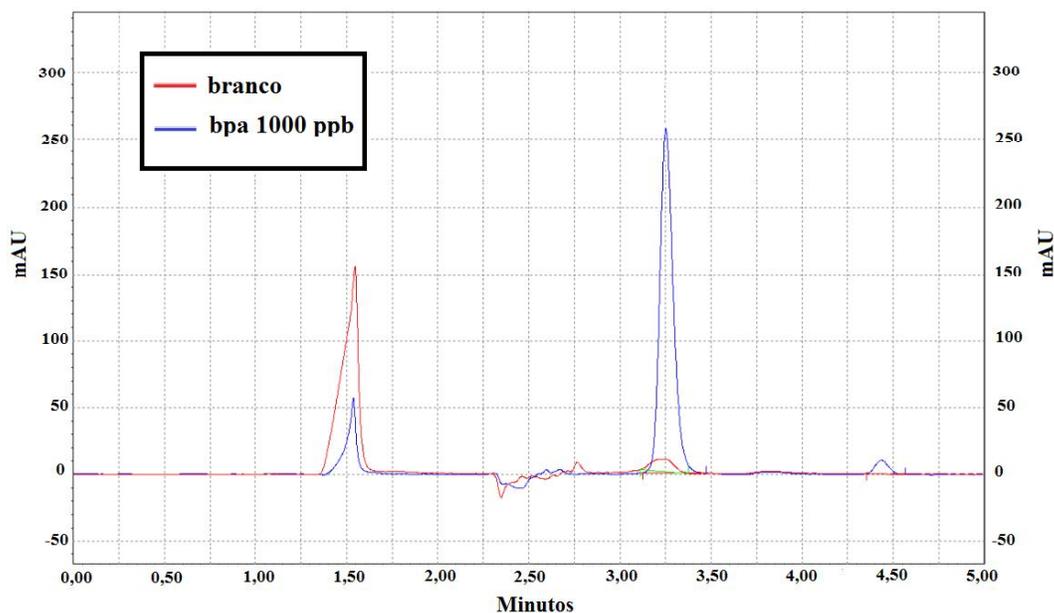
Tabela 27 – Resultados para o ensaio de recuperação em média concentração (1000 ppb) para o simulante C (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, comprimento de onda do detector 201 nm, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)

Corrida	Concentração (ppb)	Recuperação (%)
Condição padrão	1000,00	100,0
1	983,24	98,3
2	1007,81	100,8
3	1003,30	100,3
Média	998,12	99,8
CV (%)	1,3	1,3

Tabela 28 – Resultados para o ensaio de recuperação em alta concentração (2000 ppb) para o simulante C (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, comprimento de onda do detector 201 nm, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)

Corrida	Concentração (ppb)	Recuperação (%)
Condição padrão	2000,00	100,0
1	2080,97	104,0
2	2088,60	104,4
3	1981,54	99,1
Média	2050,37	102,5
CV (%)	2,9	2,9

Figura 25 – Cromatograma obtido no ensaio utilizado para avaliação da especificidade do método desenvolvido para o simulante C, e cromatograma típico do bisfenol A 1000 ppb (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, comprimento de onda do detector 201 nm, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)



Quanto à robustez do método analítico desenvolvido para o simulante C, a Tabela 29 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 29 – Resultados obtidos para o ensaio de robustez do método desenvolvido para o simulante C, onde TR é o tempo de retenção, TRR é o tempo de retenção relativo ao padrão, R é a resposta obtida na condição testada e RR é a resposta relativa ao padrão (condições padrão: fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água (70:30), volume de injeção 25 µl, temperatura do forno da coluna a 40 °C e detector UV a 201 nm)

Condição	TR (min)	TRR (%)	R	RR (%)
Padrão	3,24	100,0	1471418,0	100,0
Fase móvel (69:31)	3,29	101,4	1463564,7	99,5
Fase móvel (71:29)	3,20	98,8	1484755,3	100,9
Temperatura coluna 39 °C	3,25	100,3	1468476,0	99,8
Temperatura coluna 41 °C	3,24	99,8	1465396,7	99,6
Comprimento de onda 199 nm	3,24	100,0	1679265,7	114,1
Comprimento de onda 203 nm	3,24	100,00	1179675,3	80,2
Fluxo 0,9 ml/min	3,62	111,7	1618241,3	110,0
Fluxo 1,1 ml/min	2,95	91,0	1335163,7	90,7

O maior valor para tempo de retenção (3,62 minutos, que representa 111,7 % daquele em condição padrão) foi aquele obtido com fluxo de 0,9 ml/min, enquanto para fluxo de 1,1 ml/min o bisfenol foi detectado no menor tempo (2,95 minutos, que representa 91,0 % do padrão). Mais uma vez, a variação no fluxo da fase móvel interferiu com maior intensidade no valor do tempo de retenção.

A variação no comprimento de onda utilizado pelo detector foi, novamente, aquela que mais interferiu na intensidade da resposta. O maior valor (1679265,7, ou 114,1 % do padrão) foi alcançado a 199 nm, enquanto o menor (1179675,3, ou 80,2 % do padrão) foi obtido a 203 nm.

5.5 Simulante D

As curvas de calibração obtidas para o simulante D, além das equações da reta e coeficientes de determinação (r^2) estão contidas nas Figuras 26, 27 e 28.

Figura 26 – Primeira curva de calibração para o simulante D (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, comprimento de onda do detector 201 nm, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)

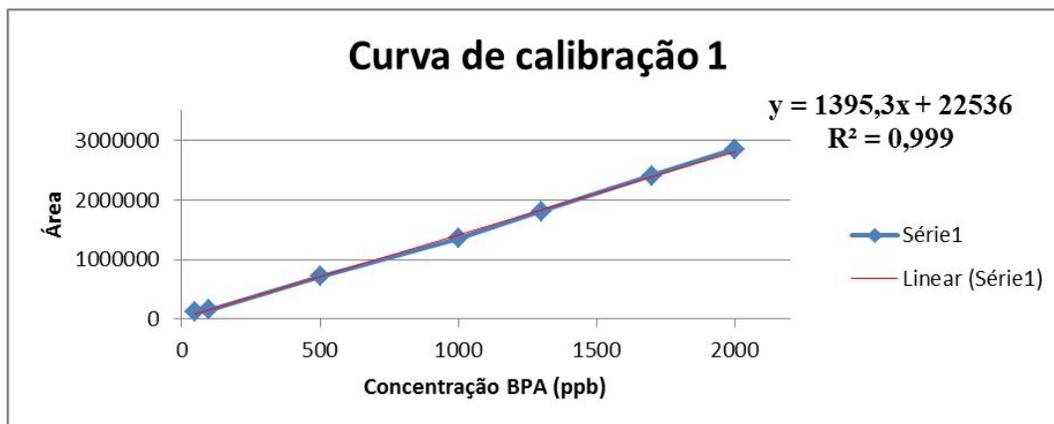


Figura 27 – Segunda curva de calibração para o simulante D (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, comprimento de onda do detector 201 nm, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)

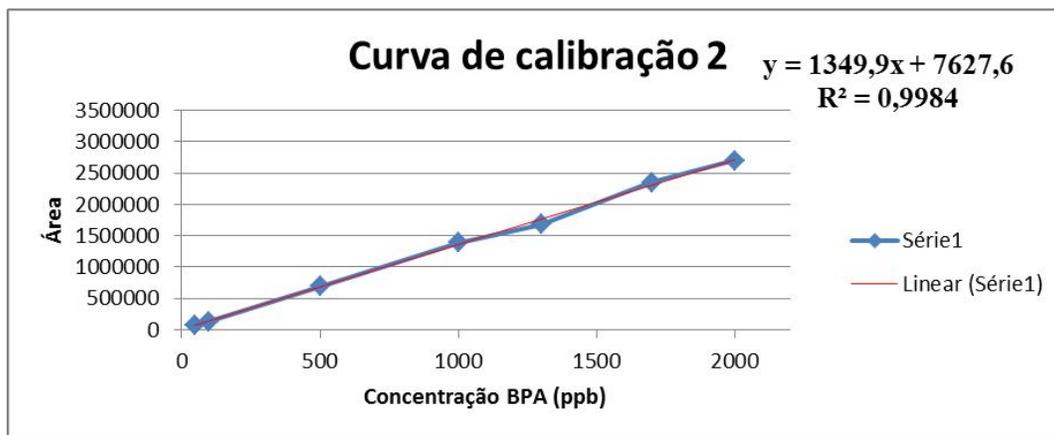
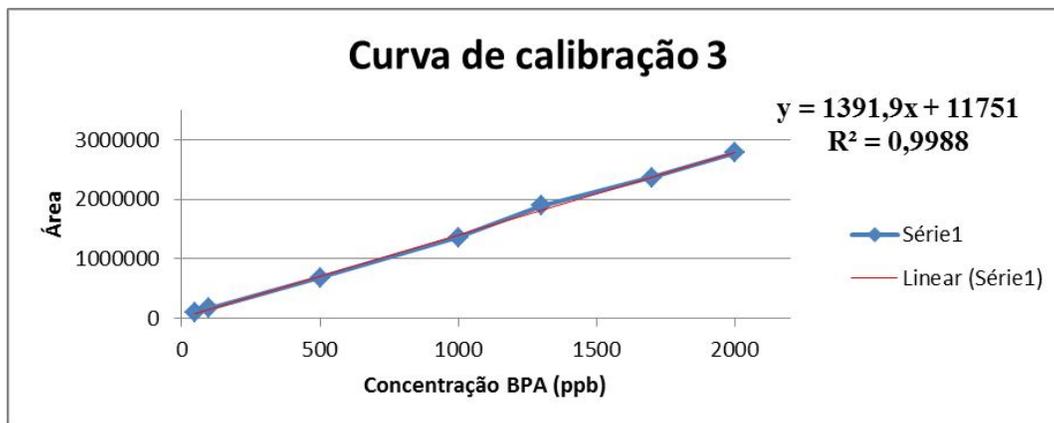


Figura 28 – Terceira curva de calibração para o simulante D (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, comprimento de onda do detector 201 nm, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)



O método desenvolvido para o simulante D apresentou linearidade no intervalo de concentração testado, o que pode ser evidenciado pelo fato de que todos os valores de R^2 apresentaram-se superiores ao mínimo exigido (0,99) pelos guias de validação utilizados (BRASIL, 2003; INMETRO, 2010).

A estimativa do limite de detecção (LD) do método foi de 13,7 ppb, enquanto para o limite de quantificação ficou em 45,6 ppb. Destarte, o método mostrou sensibilidade adequada para a finalidade proposta.

A Tabela 30 apresenta os resultados referentes ao ensaio de repetibilidade, incluindo o valor médio, desvio padrão e o coeficiente de variação (CV).

Os resultados (2,0%) atestam boa repetibilidade para o método desenvolvido, estando dentro dos limites legais (5%) (BRASIL, 2003).

A Tabela 31 apresenta os resultados dos ensaios para a determinação da precisão intermediária entre dias diferentes, bem como desvio padrão e coeficiente de variação (CV) entre os mesmos. Os valores individuais obtidos para cada corrida, por sua vez, estão inseridos no Apêndice D.

Os resultados referentes aos ensaios para a determinação da precisão intermediária entre analistas diferentes encontram-se na Tabela 32. Os valores individuais obtidos para cada corrida encontram-se no Apêndice D.

Tabela 30 – Resultados do ensaio de repetibilidade para o simulante D (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, comprimento de onda do detector 201 nm, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)

Repetição	Área sob a curva
1	1406629
2	1397682
3	1426848
4	1449357
5	1458433
6	1390672
Média	1421603,5
Desvio padrão	27955,0
CV (%)	2,0

Tabela 31 – Resultados para o ensaio de precisão realizado em dias diferentes pelo mesmo analista para o simulante D (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, comprimento de onda do detector 201 nm, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)

Dia de análise	Resposta média
1	1394158,3
2	1431318,2
3	1421603,5
Média	1415693,3
Desvio Padrão	26276,0
CV (%)	1,9

Tabela 32 – Resultados para o ensaio de precisão realizado em um mesmo dia por analistas diferentes para o simulante D (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, comprimento de onda do detector 201 nm, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)

Analista	Resposta média
1	1431318,2
2	1455717,3
3	1437656,7
Média	1441564,1
Desvio Padrão	17252,8
CV (%)	1,2

Os resultados de coeficiente de variação determinados encontram-se em concordância com aqueles citados pela literatura (2,20%) (GRUMETTO *et al.*, 2008). Todos os valores se encontram abaixo daquele estabelecido pela Anvisa (5%) (BRASIL, 2003).

As Tabelas 33, 34 e 35 apresentam os resultados relacionados ao ensaio de recuperação em baixa (50 ppb), média (1000 ppb) e alta concentração (2000 ppb).

A recuperação do método em baixa, média e alta concentração foi determinada como, respectivamente: 92,6% (CV= 1,8%), 99,9% (CV= 0,9%) e 104,8% (CV= 2,7%). Dessa maneira, constatou-se que o método desenvolvido apresentou boa recuperação.

O cromatograma obtido na avaliação da especificidade do método desenvolvido para o simulante D se apresenta na Figura 29, bem como o cromatograma obtido para o bisfenol a 1000 ppb.

Não houve aparecimento de picos cromatográficos na região adjacente àquela ocupada pelo bisfenol A (3,25 minutos) dos cromatogramas, fato que confirma a ausência de compostos interferentes na investigação cromatográfica do bisfenol A.

Tabela 33 – Resultados para o ensaio de recuperação em baixa concentração (50 ppb) para o simulante D (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, comprimento de onda do detector 201 nm, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)

Corrida	Concentração (ppb)	Recuperação (%)
Condição padrão	50,00	100,0
1	46,92	93,8
2	46,63	93,3
3	45,39	90,8
Média	46,31	92,6
CV (%)	1,8	1,8

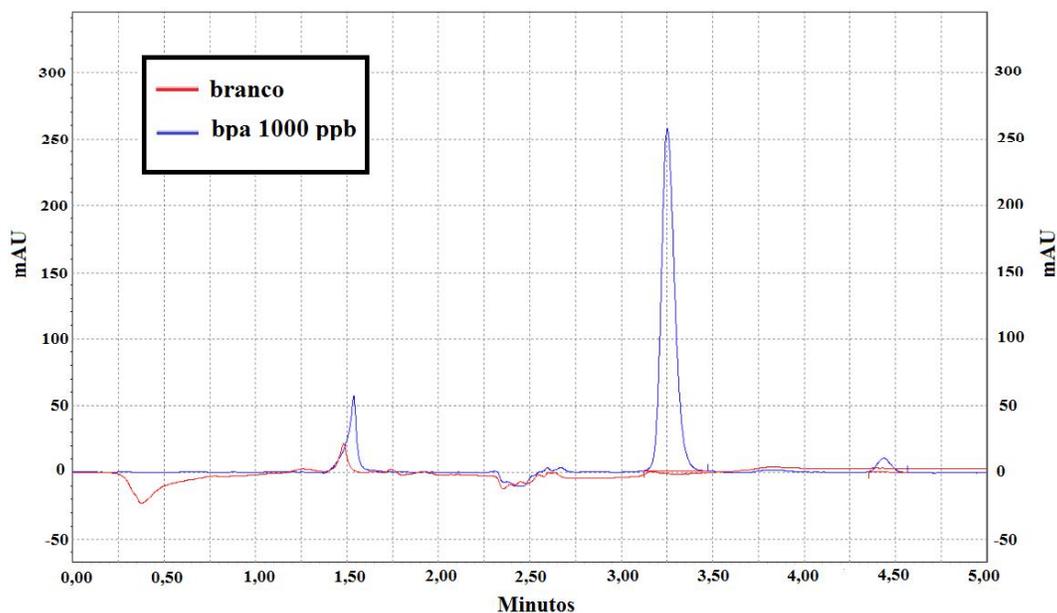
Tabela 34 – Resultados para o ensaio de recuperação em média concentração (1000 ppb) para o simulante D (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, comprimento de onda do detector 201 nm, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)

Corrida	Concentração (ppb)	Recuperação (%)
Condição padrão	1000	100
1	992,64	99,3
2	994,39	99,4
3	1009,60	101,0
Média	998,88	99,9
CV (%)	0,9	0,9

Tabela 35 – Resultados para o ensaio de recuperação em alta concentração (2000 ppb) para o simulante D (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, comprimento de onda do detector 201 nm, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)

Corrida	Concentração (ppb)	Recuperação (%)
Condição padrão	2000,00	100,0
1	2149,70	107,5
2	2035,84	101,8
3	2103,43	105,2
Média	2096,32	104,8
CV (%)	2,7	2,7

Figura 29 – Cromatograma obtido no ensaio utilizado para avaliação da especificidade do método desenvolvido para o simulante D, e cromatograma típico do bisfenol A 1000 ppb (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, comprimento de onda do detector 201 nm, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)



A Tabela 36 apresenta os resultados obtidos para o ensaio de robustez para o método desenvolvido.

Tabela 36 – Resultados obtidos para o ensaio de robustez do método desenvolvido para o simulante D, onde TR é o tempo de retenção, TRR é o tempo de retenção relativo ao padrão, R é a resposta obtida na condição testada e RR é a resposta relativa ao padrão (condições padrão: fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água (70:30), volume de injeção 25 µl, temperatura do forno da coluna a 40 °C e detector UV a 201 nm)

Condição	TR (min)	TRR (%)	R	RR (%)
Padrão	3,25	100,0	1116885,50	100,0
Fase móvel (69:31)	3,28	101,0	1118299,17	100,1
Fase móvel (71:29)	3,20	98,4	1089754,17	97,6
Temperatura coluna 39 °C	3,21	98,7	1106624,17	99,1
Temperatura coluna 41 °C	3,19	98,2	1056534,17	94,6
Comprimento de onda 199 nm	3,24	99,7	1275293,33	114,2
Comprimento de onda 203 nm	3,24	99,7	901592,17	80,7
Fluxo 0,9 ml/min	3,63	111,6	1235314,83	110,6
Fluxo 1,1 ml/min	2,95	90,8	1018548,67	91,2

O maior valor para tempo de retenção (3,63 minutos, ou ainda 111,6 % daquele em condição padrão) foi aquele obtido com fluxo de 0,9 ml/min, enquanto para fluxo de 1,1 ml/min o bisfenol apresentou-se no menor tempo de retenção (2,95 minutos, que representa 90,8 % do padrão). Como em todos os casos anteriormente descritos, a variação no fluxo da fase móvel interferiu com maior intensidade no valor do tempo de retenção.

A variação no comprimento de onda utilizado pelo detector foi, novamente, aquela que mais interferiu na intensidade da resposta. O maior valor (1275293,3, ou 114,2 % do padrão) foi alcançado a 199 nm, enquanto o menor (901592,2, valor equivalente a 80,7 % do padrão) foi obtido a 203 nm.

5.6 Considerações finais

O método cromatográfico com detector PDA para determinação de bisfenol A em simulantes de alimentos usado neste trabalho apresentou limites de detecção e quantificação superiores àqueles observados no método cromatográfico com detector de fluorescência (1,1 e 3,7 ppb, respectivamente) (GRUMETO *et al.*, 2008), contudo apresenta as vantagens de acessibilidade, custo e permite uma quantificação do analito em ensaios de migração, por exemplo, na ordem de 500 ppb, concentração de bisfenol A presente em um simulante considerando uma embalagem de policarbonato com massa de 100 g e volume de 1,2 litros, e, segundo Gómes e colaboradores (2009), um limite máximo de migração específica de bisfenol A de 0,6 mg/kg de embalagem.

Fazendo-se uma análise comparativa entre os resultados obtidos para linearidade do método, verifica-se que o maior de todos os valores para coeficiente de determinação (r^2) foi 0,9996, obtido para a segunda curva construída para o simulante A. O mesmo simulante, além disso, obteve os melhores valores para linearidade (r^2 médio de 0,99923). O menor valor obtido (0,9972) pertence ao simulante B. Este simulante também se mostrou a menor linearidade dentre os testados, apresentando um r^2 médio de 0,99737.

O simulante C apresentou a maior sensibilidade, apresentando os menores valores para a estimativa dos limites de detecção e quantificação, respectivamente 4,8 e 16,1 ppb. O simulante A, por sua vez, foi aquele que obteve os resultados mais elevados para estes mesmos parâmetros: limite de detecção de 14,7 ppb e limite de quantificação de 48,9 ppb.

Com relação à repetibilidade, os valores mais baixos ficaram com o simulante D (CV de 2,0%). O simulante B apresentou os resultados menos precisos, representados pelo coeficiente de variação de 3,74%.

Quanto à precisão entre dias diferentes o simulante B obteve os melhores resultados (CV de 0,14%), enquanto o simulante D ficou com aqueles relativos a uma menor precisão (CV de 1,9%) dentre os simulantes.

Na comparação entre os resultados obtidos para avaliação da precisão entre analistas distintos os resultados mais baixos para coeficiente de variação foram obtidos pelo simulante C (CV de 0,14%). Os valores mais elevados, por sua vez, foram obtidos durante a avaliação para o simulante A (CV de 1,76%).

Um ponto interessante de ser comentado diz respeito aos resultados obtidos para a precisão para o simulante B. Este simulante mostrou a melhor repetibilidade dentre os quatro simulantes testados, mas também apresentou os piores resultados para precisão entre dias diferentes. É importante lembrar que o simulante B apresenta na sua composição 3% de ácido acético, sendo uma das possibilidades a degradação química do analito. Esta hipótese, entretanto, está em desacordo com a elevada estabilidade química do bisfenol A (DAAS & HAMDAOUI, 2010). Outra característica que o simulante B apresenta é um maior tempo necessário para evaporação durante a etapa de tratamento da amostra quando comparado aos outros simulantes (2 horas para o simulante B; 1 hora e 45 minutos para os HPLC A e C; 1 hora para o simulante D). Um maior tempo de exposição ao aquecimento poderia implicar em alguma variação no desempenho do concentrador rotacional e explicaria resultados diferentes obtidos em dias diferentes, além de justificar resultados semelhantes na etapa de concentração da amostra realizada em mesmo dia.

Quanto à avaliação da recuperação, o resultado mais baixo (92,3%) foi obtido pelo para o simulante B, enquanto o mais elevado (104,8%) pertenceu ao simulante D. Mais três pontos chamam a atenção quando se analisa os resultados relacionados à recuperação. O primeiro deles é que todos os resultados obtidos para a recuperação em baixa concentração estão abaixo de 100%, exceto aquele obtido para o simulante C (104,6%). O segundo ponto consiste no fato de que todos os resultados de recuperação em alta concentração se encontram acima de 100%, exceto o resultado do simulante B (92,3%). O terceiro ponto se refere ao fato de que, para um mesmo método, a recuperação no ponto médio sempre esteve mais próxima ao ideal do que naquelas condições de baixa e alta concentração.

Quanto à robustez, pode-se citar inicialmente que o menor resultado obtido para tempo de retenção pertence ao simulante D (90,8% do padrão), enquanto o maior está relacionado ao simulante C (111,7%). Os simulantes B e D obtiveram, respectivamente, o menor (78,7% do padrão) e o maior valor (114,2% do padrão) para intensidade da resposta. Os valores obtidos para os quatro simulantes, entretanto, foram semelhantes.

A Tabela 37 apresenta um resumo dos resultados obtidos na validação do método desenvolvido neste trabalho.

Tabela 37 – Resultados obtidos para a validação do método desenvolvido para determinação de bisfenol A em simulantes de alimentos

Parâmetro	Simulante A	Simulante B	Simulante C	Simulante D
Coeficiente de determinação (r^2)	0,9993	0,9972	0,9988	0,9990
	0,9996	0,9976	0,9988	0,9984
	0,9988	0,9973	0,9990	0,9988
LD (ppb)	14,7	7,8	4,8	13,7
LQ (ppb)	48,9	26	16,1	45,6
Repetibilidade CV (%)	2,07	3,74	2,84	2,0
Precisão Interdias CV (%)	1,05	0,14	1,37	1,9
Precisão Interanalista CV (%)	1,76	0,2	0,14	1,2
Recuperação a 50 ppb (%) / [CV (%)]	97,9 [1,3]	94,8 [4,8]	104,6 [2,5]	92,6 [1,8]
Recuperação a 1000 ppb (%) / [CV (%)]	99,2 [0,7]	99,8 [0,2]	99,8 [1,3]	99,9 [0,9]
Recuperação a 2000 ppb (%) / [CV (%)]	103,6 [0,4]	92,3 [1,8]	102,5 [2,9]	104,8 [2,7]

6 CONCLUSÕES

O sistema fase móvel acetonitrila-água (70:30) em condições isocráticas apresentou a maior sensibilidade dentre todas as fases móveis testadas. Ademais, sua utilização confere um tempo baixo de análise e um baixo consumo de acetonitrila.

A temperatura do forno da coluna oferece melhores resultados quando fixada em 40 °C, fornecendo maior intensidade de resposta, menores valores de tempo de retenção, além de um menor consumo de acetonitrila.

O detector de arranjo de diodos oferece melhor resposta para o bisfenol A no comprimento de onda de 201 nm.

O tempo de retenção do bisfenol A se situou em 3,25 minutos quando determinado nas condições de análise consideradas excelentes neste trabalho.

Para os simulantes A e C, o tratamento da amostra desenvolvido consistiu na evaporação de 1 ml de amostra a 60 °C durante 1 hora e 45 minutos, seguida de sua ressuspensão utilizando o mesmo volume de solução de acetonitrila-água (40:60). Os procedimentos utilizados para os tratamentos das amostras para os demais simulantes (B e D) foram idênticos àqueles supracitados, exceto quanto ao tempo de evaporação (2 horas para simulante B, 1 hora para o simulante D).

O método desenvolvido apresentou todos os parâmetros de validação dentro dos limites estabelecidos pela legislação vigente, estando destarte plenamente validado, podendo assim, ser considerado uma ferramenta aplicável aos ensaios de migração de bisfenol A nos diversos simulantes de alimentos estudados.

REFERÊNCIAS

ARNICH, N.; CANIVENC-LAVIER, M.; KOLF-CLAUW, M.; COFFIGNY, H.; CRAVEDI, J. P.; GROB, K.; MACHEREY, A. C.; MASSET, D.; MAXIMILIEN, R.; NARBONNE, J. F.; NESSLANY, F.; STADLER, J.; TULLIEZ, J. **Conclusions of the French Food Safety Agency on the toxicity of bisphenol A.** International Journal of Hygiene and Environment Healthy 214, 271-275. 2011.

ASIMAKOPOULUS, A. G.; THOMAIDIS, N. S.; KOUPPARIS, M. A. **Recent trends in biomonitoring of bisphenol A, 4-t-octylphenol, and 4-nonylphenol.** Toxicology Letters, doi:10.1016/j.toxlet.2011.07.032. 2011.

AYALLA, H. G.; MOYANO, E.; GALCERAN, M. T.; **On-line solid phase extraction fast liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of bisphenol A and its chlorinated derivatives in water samples.** Journal of Chromatography A 1217, p. 3511-3518. 2010.

AZEREDO, H. M. C. **Fundamentos de estabilidade de alimentos.** Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical 195 p. Editora Técnica. 2004.

BALAKRISHNAN, B.; HENARE, K.; THORSTENSEN, E. B.; PONNAMPALAM, A. P.; MITCHELL, M. D.; **Transfer of bisphenol A across the human placenta.** Am. J. Obstet. Gynecol. p. 202 – 393. e 1-7. 2010.

BERONIUS, A.; RUDÉN, C.; HAKANSSON, H.; HANBERG, A. **Risk to all or none? A comparative analysis of controversies in the health risk assessment of Bisphenol A.** Reproductive Toxicology 29, p. 132–146. 2010.

BLOOM, M. S.; KIM, D. B. S.; VOM SAAL, F. S.; TAYLOR, J. A.; CHENG, B. S. G.; LAMB, J. D.; FUJIMOTO, V. Y. **Bisphenol A exposure reduces the estradiol response to gonadotropin stimulation during *in vitro* fertilization.** Fertility and Sterility, Vol 96, nº 3. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos” anexo. DOU 02/06/03. Disponível em < http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em 20 de abril de 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. RDC nº 51, de 26 de novembro de 2010. Dispõe sobre migração em materiais, embalagens e equipamentos plásticos destinados a entrar em contato com alimentos. Diário Oficial Nº 228 – DOU – 30/11/10 – seção 1-

p.105. Disponível em < ftp://ftp.saude.sp.gov.br/ftpssp/bibliote/informe_eletronico/2010/Iels.nov.10/Iels226/U_RS-MS-ANVISA-RDC-51_261110.pdf> Acesso em 20 de abril de 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. RDC nº 41, de 16 de setembro de 2011. Dispõe sobre a proibição de uso de bisfenol A em mamadeiras destinadas a alimentação de lactentes e dá outras providências. Diário Oficial Nº 152 – DOU – 11/08/09 – seção 1- p.39. Disponível em <ftp://ftp.saude.sp.gov.br/ftpssp/bibliote/Informe_eletronico/2011/iels.set.11/Iels177/U_RS-MS-ANVISA-RDC-41_160911.pdf> Acesso em 20 de abril de 2012.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas – SP. Editora da UNICAMP. 2006.

DAAS, A.; HANDAOUI, O. **Extraction of bisphenol A from aqueous solutions by emulsion liquid membrane**. Journal of Membrane Science 348, p. 360–368. 2010.

DEKANT, W.; VÖLKEL, W. **Human exposure to bisphenol A by biomonitoring: Methods, results and assessment of environmental exposures**. Toxicology and Applied Pharmacology 228, p. 114–134. 2008.

DOERGE, D. R.; TWARDDE, N. C.; VANLANDIGHAM, M.; FISHER, J. W. **Pharmacokinetics of bisphenol A in neonatal and adult Sprague-Dawley rats**. Toxicology and Applied Pharmacology 247, p. 158–165. 2010.

DOERGE, D. R.; TWARDDE, N. C.; VANLANDIGHAM, M.; BROWN, R. P.; FISHER, J. W. **Distribution of bisphenol A into tissues of adult, neonatal, and fetal Sprague-Dawley rats**. Toxicology and Applied Pharmacology 255, p. 261–270. 2011.

DONG, S.; TERASAKA, S.; KIYAMA, R. **Bisphenol A induces a rapid activation of Erk1/2 through GPR30 in human breast cancer cells**. Environmental Pollution 159, p. 212–218. 2011.

ERLER, C.; NOVAK, J. **Bisphenol A Exposure: Human Risk and Health Policy**. Journal of Pediatric Nursing 25, p. 400–407. 2010.

FERRER, E.; SANTONI, E.; VITTORI, S.; FONT, G.; MAÑES, J.; SAGRATINI, G. **Simultaneous determination of bisphenol A, octylphenol, and nonylphenol by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry in powdered milk and infant formulas**. Food Chemistry 126, p. 360–367. 2011.

GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. G. **Tecnologia de Alimentos: Princípios e aplicações**. S. Paulo, Livr. Nobel S.A., 2009.

GEENS, T.; GOEYENS, L.; COVACI, A. **Are potential sources for human exposure to bisphenol-A overlooked?** International Journal of Hygiene and Environmental Health, 214, p. 339-347. 2011.

GÓMES, A. B.; RUBIO, S.; BENDITO, D. P. **Analytical methods for the determination of bisphenol A in food**. Journal of Chromatography A 1216, p. 449-469. 2009.

GRUMETTO, L.; MONTESANO, D.; SECCIA, S.; ALBRIZIO, S.; BARBATO, F. **Determination of Bisphenol A and Bisphenol B Residues in Canned Peeled Tomatoes by Reversed-Phase Liquid Chromatography**. J. Agric. Food Chem. 56, p. 10633–10637. 2008.

HANIOKA N.; NAITO, T.; NARIMATSU, S. **Human UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in bisphenol A glucuronidation**. Chemosphere 74, p. 33-36. 2008.

HUANG, Y. Q.; WONG, C. K. C.; ZHENG, J. S.; BOUWMAN, H.; BARRA, R.; WAHLSTROM, B.; NERETIN, L.; WONG, M. H. **Bisphenol A (BPA) in China: A review of sources, environmental levels, and potential human health impacts**. Environ Int. Doi: 10.1016/j.envint.2011.04.010. 2011.

INMETRO, Orientação sobre validação de métodos analíticos DOQ-CGCRE-008, Revisão 03 – FEV/2010. Documento de caráter orientativo.

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

LAU, O. W.; WONG, S. K. **Contamination in food from packaging material**. Journal of Chromatography A 882, p. 255-270. 2000.

LIU, Z.; WOLFF, M. S.; MOLINE, J. **Analysis of environmental biomarkers in urine using an electrochemical detector**. J. Chromatogr. B 819, p. 155–159. 2005.

MAIA, J.; CRUZ, J. M.; SENDÓN, R.; BUSTOS, J.; CIRUGEDA, M. E.; SANCHEZ, J. J.; PASEIRO, P.; **Effect of amines in the release of bisphenol A from polycarbonate baby bottles**. Food Research International 43, p. 1283–1288. 2010.

MALONEA, E. M.; ELLIOTT, C. T.; KENNEDY, D. G.; REGANA, L. **Rapid confirmatory method for the determination of sixteen synthetic growth promoters and bisphenol A in bovine milk using dispersive solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry.** *Journal of Chromatography B* 878, p. 1077–1084. 2010.

MERCOSUL, GMC/RES. N° 32/10. **Reglamento técnico MERCOSUL sobre migración en materiales, embalagens e equipamentos plásticos destinados a entrar em contato com alimentos.** 2010.

MITA, L.; BIANCO, M.; VIGGIANO, E.; ZOLLO, F.; BENCIVENGA, U.; SICA, V.; MONACO, G.; PORTACCIO, M.; DIANO, N.; COLONNA, A.; LEPORE, M.; CANCELIGLIA, P.; MITA, D. G. **Bisphenol A content in fish caught in two different sites of Tyrrhenian Sea (Italy).** *Chemosphere* 82, p. 405–410. 2011.

MOREAU, R. L. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B. **Toxicologia Analítica.** RJ. Ed. Guanabara Koogan. 2008.

NAKAMURA, D.; YANAGIBA, Y.; DUAN, Z.; ITO, Y.; OKAMURA, A.; ASAEDA, N.; TAGAWA, Y.; LI, C.; TAYA, K.; ZHANG, S.; NAITO, H.; RAMDHAN, D. H.; KAMIJIMA, M.; NAKAJIMA, T. **Bisphenol A may cause testosterone reduction by adversely affecting both testis and pituitary systems similar to estradiol.** *Toxicology Letters* 194, p. 16–25. 2010.

PALANZA, P. L.; HOWDESHELL, K. L.; PARMIGIANI, S.; VOM SAAL, F. S. **Exposure to a low dose of bisphenol A during fetal life or in adulthood alters maternal behavior in mice.** *Environ Health Perspect* 110 (Suppl 3), p. 415–422. 2002.

PRINS, G. S.; BIRCH, L.; TANG, W. Y.; HO, S. M. **Developmental estrogen exposures predispose to prostate carcinogenesis with aging.** *Reprod Toxicol* 23, p. 374–382. 2007.

SAAL, F. S. V.; WELSHONS, W. V.; **Large effects from small exposures. II. The importance of positive controls in low-dose research on bisphenol A.** *Environmental Research* 100, p. 50–76. 2006.

SERRANO, N. O.; WARDEN, C. F.; CABRERA, M. F. F. **Seguridad Farmacológica y ambiental: disrupción endócrina.** *Endocrinol Nutr.* 55(Supl 1), p. 63–68. 2008.

SOTO, A. M.; SONNENSCHNEIN, C.; CHUNG, K. L.; FERNANDEZ, M. F.; OLEA, N.; SERRANO, F. O. **The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an**

update on estrogenic environmental pollutants. Environ Health Perspect 103 (Suppl 7), p. 113–122. 1995.

THOMSON, B. M.; CRESSEY, P. J.; SHAW, I. C. **Dietary exposure to xenoestrogens in New Zealand.** J Environ Monit, p. 229–235. 2003.

TYL, R.W.; MYERS, C.B.; MARR, M.C.; THOMAS, B.F.; KEIMOWITZ, A.R.; BRINE, D.R.; VESELICA, M.M.; FAIL, P.A.; CHANG, T.Y.; SEELY, J.C.; JOINER, R.L.; BUTALA, J.H.; DIMOND, S.S.; CAGEN, S.Z.; SHIOTSUKA, R.N.; STROPP, G.D.; WAECHTER, J.M. **Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague–Dawley rats.** Toxicol. Sci 68, p. 121–146. 2002.

VOM SAAL, F. S.; COOKE, P. S.; BUCHANAN, D. L.; *et al.* **A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior.** Toxicol Ind Health 14, p. 239–260. 1998.

WEI, X.; HUANG, Y.; WONG, M. H.; GIESY, J. P.; WONG, C. K. C. **Assessment of risk to humans of bisphenol A in marine and freshwater fish from Pearl River Delta, China.** Chemosphere 85, p. 122–128. 2011.

WOZNIAK, A. L.; BULAYEVA, N. N.; WATSON, C. S. **Xenoestrogens at picomolar to nanomolar concentrations trigger membrane estrogen receptor-alpha-mediated Ca²⁺ fluxes and prolactin release in GH3/B6 pituitary tumor cells.** Environ Health Perspect 113, p. 431–439. 2005.

YOKOTA, H.; IWANO, H.; ENDO, M.; *et al.* **Glucuronidation of the environmental oestrogen bisphenol A by an isoform of UDP-glucuronosyltransferase, UGT2B1, in the rat liver.** Biochem J 340 (Pt 2), p. 405–409. 1999.

YOSHIDA, T.; HORIE, M.; HOSHINO, Y.; NAKAZAWA, H. **Determination of bisphenol A in canned vegetables and fruit by high performance liquid chromatography.** Food Addit Contam. Jan:18(1):69-75. 2001.

APÊNDICE A - Resultados individuais obtidos nos ensaios para determinação da precisão intermediária do simulante A

Tabela 1 – Valores de área sob pico, média, desvio padrão e coeficiente de variação obtidos para as seis repetições do ensaio de precisão intermediária realizadas no Dia 1, pelo Analista 1 para o simulante A (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)

Repetição	Área sob a curva
1	1362379
2	1437999
3	1464179
4	1443458
5	1368641
6	1320545
Média	1399533,5
Desvio padrão	56854,2
CV (%)	4,06

Tabela 2 – Valores de área sob pico, média, desvio padrão e coeficiente de variação obtidos para as sete repetições do ensaio de precisão intermediária realizadas no Dia 2, pelo Analista 1 para o simulante A (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)

Repetição	Área sob a curva
1	1398945
2	1380339
3	1394532
4	1311366
5	1385182
6	1403266
Média	1378938,3
Desvio padrão	34182,5
CV (%)	2,48

Tabela 3 – Valores de área sob pico, média, desvio padrão e coeficiente de variação obtidos para as sete repetições do ensaio de precisão intermediária realizadas no Dia 3, pelo Analista 1 para o simulante A (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)

Repetição	Área sob a curva
1	1372398
2	1422683
3	1442849
4	1385778
5	1416068
6	1366329
Média	1401017,5
Desvio padrão	30660,7
CV (%)	2,19

Tabela 4 – Valores de área sob pico, média, desvio padrão e coeficiente de variação obtidos para as sete repetições do ensaio de precisão intermediária realizadas no Dia 2, pelo Analista 2 para o simulante A (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)

Repetição	Área sob a curva
1	1382599
2	1356008
3	1305221
4	1333452
5	1363734
6	1328253
Média	1344877,8
Desvio padrão	27863,7
CV (%)	2,07

Tabela 5 – Valores de área sob pico, média, desvio padrão e coeficiente de variação obtidos para as sete repetições do ensaio de precisão intermediária realizadas no Dia 2, pelo Analista 3 para o simulante A (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)

Repetição	Área sob a curva
1	1334736
2	1383550
3	1388803
4	1382999
5	1405161
6	1339760
Média	1372501,5
Desvio padrão	28505,7
CV (%)	2,08

APÊNDICE B - Resultados individuais obtidos nos ensaios para determinação da precisão intermediária do simulante B

Tabela 1 – Valores de área sob pico, média, desvio padrão e coeficiente de variação obtidos para as seis repetições do ensaio de precisão intermediária realizadas no Dia 1, pelo Analista 1 para o simulante B (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)

Repetição	Área sob a curva
1	1307754
2	1286947
3	1458000
4	1308857
5	1400774
6	1193427
Média	1325959,8
Desvio padrão	92458,3
CV (%)	6,97

Tabela 2 – Valores de área sob pico, média, desvio padrão e coeficiente de variação obtidos para as sete repetições do ensaio de precisão intermediária realizadas no Dia 2, pelo Analista 1 para o simulante B (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)

Repetição	Área sob a curva
1	1209642
2	1260484
3	1302418
4	1463708
5	1542914
6	1160854
Média	1323336,7
Desvio padrão	149421,2
CV (%)	11,3

Tabela 3 – Valores de área sob pico, média, desvio padrão e coeficiente de variação obtidos para as sete repetições do ensaio de precisão intermediária realizadas no Dia 3, pelo Analista 1 para o simulante B (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)

Repetição	Área sob a curva
1	1382881
2	1388329
3	1381893
4	1431687
5	1334977
6	1209891
Média	1354943
Desvio padrão	77394,9
CV (%)	5,7

Tabela 4 – Valores de área sob pico, média, desvio padrão e coeficiente de variação obtidos para as sete repetições do ensaio de precisão intermediária realizadas no Dia 2, pelo Analista 2 para o simulante B (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)

Repetição	Área sob a curva
1	1170352
2	1357454
3	1423003
4	1217347
5	1588387
6	1206162
Média	1327117,5
Desvio padrão	161016,3
CV (%)	12,1

Tabela 5 – Valores de área sob pico, média, desvio padrão e coeficiente de variação obtidos para as sete repetições do ensaio de precisão intermediária realizadas no Dia 2, pelo Analista 3 para o simulante B (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)

Repetição	Área sob a curva
1	1304921
2	1214741
3	1286128
4	1287281
5	1344778
6	1346663
Média	1297418,7
Desvio padrão	48559,3
CV (%)	3,7

APÊNDICE C - Resultados individuais obtidos nos ensaios para determinação da precisão intermediária do simulante C

Tabela 1 – Valores de área sob pico, média, desvio padrão e coeficiente de variação obtidos para as seis repetições do ensaio de precisão intermediária realizadas no Dia 1, pelo Analista 1 para o simulante C (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)

Repetição	Área sob a curva
1	1328106
2	1362829
3	1302518
4	1277441
5	1258464
6	1312001
Média	1306893,2
Desvio padrão	36978,0
CV (%)	2,8

Tabela 2 – Valores de área sob pico, média, desvio padrão e coeficiente de variação obtidos para as sete repetições do ensaio de precisão intermediária realizadas no Dia 2, pelo Analista 1 para o simulante C (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)

Repetição	Área sob a curva
1	1274882
2	1289284
3	1361266
4	1334997
5	1343587
6	1391129
Média	1332524,2
Desvio padrão	43775,4
CV (%)	3,3

Tabela 3 – Valores de área sob pico, média, desvio padrão e coeficiente de variação obtidos para as sete repetições do ensaio de precisão intermediária realizadas no Dia 3, pelo Analista 1 para o simulante C (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)

Repetição	Área sob a curva
1	1276081
2	1363315
3	1269479
4	1308196
5	1403282
6	1422233
Média	1340431
Desvio padrão	65390,7
CV (%)	4,9

Tabela 4 – Valores de área sob pico, média, desvio padrão e coeficiente de variação obtidos para as sete repetições do ensaio de precisão intermediária realizadas no Dia 2, pelo Analista 2 para o simulante C (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)

Repetição	Área sob a curva
1	1355253
2	1364131
3	1377923
4	1269837
5	1356388
6	1256310
Média	1329973,7
Desvio padrão	52622,0
CV (%)	3,96

Tabela 5 – Valores de área sob pico, média, desvio padrão e coeficiente de variação obtidos para as sete repetições do ensaio de precisão intermediária realizadas no Dia 2, pelo Analista 3 para o simulante C (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)

Repetição	Área sob a curva
1	1352143
2	1377460
3	1170952
4	1144709
5	1370029
6	1397380
Média	1302112,2
Desvio padrão	113002,5
CV (%)	8,7

APÊNDICE D - Resultados individuais obtidos nos ensaios para determinação da precisão intermediária do simulante D

Tabela 1 – Valores de área sob pico, média, desvio padrão e coeficiente de variação obtidos para as seis repetições do ensaio de precisão intermediária realizadas no Dia 1, pelo Analista 1 para o simulante D (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)

Repetição	Área sob a curva
1	1376348
2	1375361
3	1378776
4	1399866
5	1527337
6	1307262
Média	1394158,3
Desvio padrão	72425,5
CV (%)	5,2

Tabela 2 – Valores de área sob pico, média, desvio padrão e coeficiente de variação obtidos para as sete repetições do ensaio de precisão intermediária realizadas no Dia 2, pelo Analista 1 para o simulante D (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)

Repetição	Área sob a curva
1	1420998
2	1422765
3	1462462
4	1468596
5	1405318
6	1407770
Média	1431318,2
Desvio padrão	27458,2
CV (%)	1,9

Tabela 3 – Valores de área sob pico, média, desvio padrão e coeficiente de variação obtidos para as sete repetições do ensaio de precisão intermediária realizadas no Dia 3, pelo Analista 1 para o simulante D (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)

Repetição	Área sob a curva
1	1406629
2	1397682
3	1426848
4	1449357
5	1458433
6	1390672
Média	1421603,5
Desvio padrão	27955,0
CV (%)	2,0

Tabela 4 – Valores de área sob pico, média, desvio padrão e coeficiente de variação obtidos para as sete repetições do ensaio de precisão intermediária realizadas no Dia 2, pelo Analista 2 para o simulante D (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)

Repetição	Área sob a curva
1	1451127
2	1441309
3	1443476
4	1459346
5	1467604
6	1471442
Média	1455717,3
Desvio padrão	12492,0
CV (%)	0,9

Tabela 5 – Valores de área sob pico, média, desvio padrão e coeficiente de variação obtidos para as sete repetições do ensaio de precisão intermediária realizadas no Dia 2, pelo Analista 3 para o simulante D (eluição isocrática, fluxo de 1 ml/min, fase móvel acetonitrila-água 70:30 em condição isocrática, temperatura de forno da coluna 40 °C, coluna de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 10 µm)

Repetição	Área sob a curva
1	1440653
2	1423293
3	1444665
4	1456290
5	1408823
6	1452216
Média	1437656,7
Desvio padrão	18193,2
CV (%)	1,3