

PARTE I - ENQUADRAMENTO E INTRODUÇÃO

PARTE I – ENQUADRAMENTO E INTRODUÇÃO

O período que se seguiu à 2ª Guerra Mundial foi pródigo na síntese de novos compostos químicos (Colborn, vom Saal e Soto, 1993; Safe, 2000). Nas últimas seis décadas assistimos a um grande desenvolvimento da indústria química e à introdução massiva de compostos sintéticos no ambiente (Colborn, vom Saal e Soto, 1993; Paredes, 2005). As vantagens da utilização de muitos dos químicos sintetizados, como antibióticos, pílulas contraceptivas, pesticidas, plásticos, borrachas, vernizes, têxteis, colas e milhares de outros compostos eram óbvias e assim foram libertados, muitas vezes sem quaisquer precauções, no meio ambiente (Paredes, 2005).

Dadas as mais valias destes compostos poucas pessoas se interrogaram, na altura, sobre os possíveis efeitos tóxicos nas populações animais e no Homem. Só anos mais tarde os cientistas alertaram para este problema e apenas em 1962 com a publicação do livro “Primavera Silenciosa” de Rachel Carson é que a opinião pública tomou consciência dos potenciais perigos destes compostos. Mais recentemente em 1992 com a publicação de “O Nosso Futuro Roubado” de Theo Colborn, Dianne Dumanoski e John Peterson Myers este assunto voltou a suscitar acesos debates (WHO, 2002).

1. DESREGULADORES ENDÓCRINOS

1.1. EFEITOS NAS POPULAÇÕES SELVAGENS

Os efeitos tóxicos originados por alguns destes químicos foram observados a partir da década de 50. Surgiram assim os primeiros estudos revelando alterações em populações animais. Existem vários exemplos claros de que a exposição a alguns compostos poluentes sintéticos é a causa de alterações observadas na vida selvagem (Colborn, vom Saal e Soto, 1993; Colborn, Dumanosky e Myers, 1999; WHO, 2002; McLachlan, 2005):

- 1952 – Diminuição drástica do número de águias da cabeça branca na Flórida devido a esterilidade de 80% da população.
- Final da década de 50 – Desaparecimento das lontras nos rios de Inglaterra possivelmente devido ao uso do pesticida dieldrina.
- 1970 - Diminuição do número de aves habitantes na zona dos Grandes Lagos na América do Norte. Nesta zona, alvo de descargas de efluentes de várias indústrias, o número de aves aquáticas diminuiu drasticamente em resultado de uma elevada taxa de mortalidade e malformações dos embriões. Esta situação ficou conhecida por GLEMEDS (Great Lakes Embryo Mortality, Edema and Deformity Syndrome) e mais tarde descobriu-se que se devia à exposição a bifenilos policlorados (PCB's).
- Década de 80 - Diminuição do número de répteis (jacarés) no Lago Apopka na Flórida como resultado de malformações nos órgãos genitais masculinos, alegadamente devido ao derrame accidental do pesticida organoclorado dicofol.
- 1988 - Alterações na reprodução e imunidade de mamíferos marinhos no mar Báltico, que conduziu a uma redução do número de animais, sobretudo focas e que mais tarde se descobriu ser devido à exposição a PCB's.

Estes estudos revelaram que na maioria dos casos os agentes químicos responsáveis pelos efeitos observados eram compostos hormonalmente activos, o que conduziu à descoberta de um grupo de compostos que funcionam com base num mecanismo comum, a desregulação do sistema endócrino. Este grupo de compostos designa-se actualmente por Desreguladores Endócrinos (DE).

Considera-se como DE qualquer substância exógena ou mistura de substâncias que altere a normal homeostasia do sistema endócrino causando efeitos adversos no organismo, na sua descendência ou numa sub-população (Olea, Prazos e Exposito, 1998; WHO, 2002). A lista de químicos com propriedades desreguladoras endócrinas cresce de dia para dia (Terasaka et al, 2004).

1.2. POSSÍVEIS EFEITOS PARA O HOMEM

Dados os efeitos dos DE nas populações animais os cientistas colocaram uma questão pertinente:

Se os DE são capazes de causar efeitos tão dramáticos na vida selvagem que efeitos poderão induzir no Homem?

Nas últimas décadas, a preocupação científica e o debate público, em torno dos compostos capazes de alterar o normal funcionamento do sistema endócrino, na vida selvagem e sobretudo no Homem, tem aumentado consideravelmente (WHO, 2002).

A preocupação com os DE surge da percepção dos efeitos nefastos que alguns químicos ambientais podem ter no desenvolvimento e no sistema reprodutor de espécies tão diferentes como focas, jacarés e humanos (McLachlan, 2005). Estes efeitos observados na vida selvagem, o aumento de certas patologias humanas e a confirmação laboratorial dos efeitos estrogénicos de certos poluentes, contribuíram para a crescente preocupação em torno dos DE (WHO, 2002); no entanto para alguns continua a ser difícil aceitar que o Homem seja tão vulnerável à desregulação endócrina como os jacarés, águias ou focas (Colborn, Dumanosky e Myers, 1999).

Alguns cientistas acreditam que a exposição a DE pode explicar, pelo menos em parte, algumas das alterações observadas nas últimas décadas na população humana (Sharpe e Skakkebaek, 1993; Feldman, 1997; Danzo, 1998; Lyons, 2000; Rivas et al, 2002; WHO, 2002; Myers, 2003; Tsutsumi, 2005; Paredes, 2005):

- Diminuição da fertilidade, observada em alguns países, associada no homem ao declínio da qualidade do esperma (Sharpe e Skakkebaek, 1993) e na mulher a endometriose (Myers, 2003).

- Aumento do número de malformações ao nível dos órgãos genitais masculinos (criptorquidismo e hipospadias) (Sharpe, 2003).
- Alterações do sistema nervoso e imunitário (Paredes, 2005).
- Aumento da incidência de tumores hormono-dependentes:
 - A incidência do cancro da mama aumentou nos últimos 50 anos; actualmente 1 em cada 9 mulheres irá desenvolver esta patologia no decorrer da sua vida (Safe, 1998)
 - Cancro do testículo; vários estudos sugerem que se trata de uma patologia com etiologia pré-natal (Safe, 1993).

O estudo dos efeitos da DE no Homem é bastante complexo. À excepção de alguns estudos sobre exposição ocupacional a pesticidas e de estudos sobre os efeitos do dietilestilbestrol (DES), não existem dados concretos que relacionem a exposição humana aos DE ambientais com os referidos efeitos tóxicos (Danzo, 1998; Degen e Bolt, 2000).

O caso histórico do DES tem servido como modelo dos efeitos desreguladores endócrinos no Homem (Danzo, 1998). O DES é um estrogéneo sintético e foi usado como preventivo do aborto entre 1950-1970; só mais tarde se relacionou a exposição in utero ao DES com determinadas malformações genitais e disfunções reprodutoras nas crianças nascidas de mães que tomaram DES durante a gestação. As mulheres expostas in útero ao DES apresentam redução da fertilidade, maior incidência de gravidez ectópica e adenocarcinoma das células claras vaginais, para além de alterações do sistema imunitário. Os bebés do sexo masculino expostos in útero aos DES apresentam maior incidência de malformações genitais (criptorquidismo e hipospadias) e mais tarde alterações nos espermatozóides. (Colborn, vom Saal e Soto, 1993; Ben-Jonathan e Steimetz, 1998; McLachlan, 2005).

A partir do momento em que se confirmou a relação entre a exposição in utero e os referidos efeitos, o DES deixou de ser usado como preventivo do aborto no entanto durante algum tempo foi ainda utilizado como promotor do crescimento no gado (Ben-Jonathan e Steimetz, 1998).

O caso do DES serviu também para aumentar a preocupação em torno dos efeitos dos DE no Homem.

Para além de existirem poucos estudos em populações humanas, na maioria dos casos os níveis de exposição a estes compostos são bastante baixos, sobretudo quando comparados com os níveis hormonais que existem naturalmente no organismo e com os níveis de fitoestrogénios (estrogéneos de origem vegetal) presentes na nossa alimentação (Fritsche e Steinhart, 1999). Um outro factor que contribui para dificultar o estudo dos efeitos dos DE no Homem é que a exposição a estes compostos, na maioria dos casos, não ocorre para um composto isolado mas para uma mistura de substâncias que podem ter efeitos aditivos, sinérgicos, de potenciação ou antagónicos (Danzo, 1998).

Alguns cientistas concordam que a abordagem toxicológica tradicional (avaliação da toxicidade aguda, carcinogenicidade e teratogenicidade) ao problema dos DE pode não ser a mais adequada (Bigsby et al, 1999; Myers, 2003; McLachlan, 2005).

A natureza multidisciplinar da desregulação endócrina também tem sido responsável pelas polémicas existentes uma vez que é preciso integrar o conhecimento de ecologistas, químicos, endocrinologistas, toxicologistas, zoólogos, biólogos comportamentais, bioquímicos, epidemiologistas e responsáveis pela regulação do uso de substâncias químicas (Myers, 2003; McLachlan, 2005).

Para além de tudo isto muitos dos suspeitos DE são compostos importantes a nível económico e a indústria química naturalmente, defende a segurança dos mesmos (Sheenan, 2000).

1.3. MECANISMOS DE ACÇÃO DOS DE

Os DE podem actuar por diferentes mecanismos de acção (Sonnenschein e Soto, 1998; Bigsby et al, 1999; Guillette e Gunderson, 2001; WHO, 2002):

1. Mimetizando a acção da hormona natural ou seja ligando-se ao receptor hormonal e desencadeando a resposta biológica que habitualmente ocorre na presença da hormona (acção agonista).

2. Bloqueando a acção da hormona natural; o composto liga-se ao receptor hormonal não exerce qualquer efeito mas impede a ligação da hormona (acção antagonista).
3. Alterando a síntese hormonal.
4. Alterando a normal biotransformação da hormona.
5. Alterando a concentração ou funcionamento de proteínas que se ligam normalmente à hormona condicionando o seu transporte e a concentração de hormona livre.
6. Alterando a excreção hormonal.

É preciso lembrar que o mesmo composto pode ter diferentes mecanismos de acção consoante estejamos em presença de um organismo adulto ou em desenvolvimento (Guillette e Gunderson, 2001).

Para além disso os DE podem desregular um ou vários eixos endócrinos sobretudo interferindo com os receptores pertencentes à família esteroide/tiróide/retinoide (McLachlan, 2005; WHO, 2002) que inclui os receptores das hormonas da tiróide ($TR\alpha$, $TR\beta$), os receptores dos hidrocarbonetos aromáticos (AhR) e receptores esteroides (ER).

Os órgãos reprodutores e o sistema nervoso central (SNC) são particularmente sensíveis aos níveis de hormonas estrogénicas, ao passo que as hormonas da tiróide influenciam o desenvolvimento de praticamente todos os órgãos sendo especialmente importantes no desenvolvimento do SNC (Bigsby et al, 1999).

Os DE que mimetizam as hormonas esteroides e em particular a acção do 17- β -estradiol são os que têm sido alvo de mais estudos.

2. XENOSTROGÉNEOS

2.1. *MECANISMO DE ACÇÃO DOS XENOSTROGÉNEOS*

Os compostos que desregulam a homeostasia do 17- β -estradiol são conhecidos por xenostrogéneos (estrogéneos ambientais ou ecostrogéneos) (Nagel et al, 1997) e são compostos exógenos que mimetizam a acção desta hormona geralmente por ligação ao seu receptor.

Existem vários tipos de receptores estrogénicos, os estrogéneos naturais ligam-se ao receptor estrogénico nuclear e regulam a expressão genética (Moggs, 2005). Para além dos receptores nucleares ER α e ER β (e o ER γ existente em algumas classes de animais) existem também receptores membranares e mitocondriais (McLachlan, 2005). A existência destes diversos tipos de receptores torna difícil o estudo dos efeitos dos xenostrogéneos.

2.2. *CLASSIFICAÇÃO DOS XENOSTROGÉNEOS*

Vários compostos exibem propriedades estrogénicas, nomeadamente compostos de origem vegetal, fúngica e industrial (Degen et al, 2001).

Os xenostrogéneos podem classificar-se em dois grandes grupos, os xenostrogéneos naturais e os de síntese. Dentro do grupo dos xenostrogéneos naturais existem os de origem animal (esteroides), os de origem vegetal (fitoestrogéneos) e os de origem fúngica (micoestrogéneos). Quanto aos xenostrogéneos sintéticos, dividem-se em dois grupos: os fármacos que são utilizados em terapêutica pelas suas propriedades estrogénicas (ex: etinilestradiol utilizado como contraceptivo oral) e os químicos industriais que são sintetizados com outros fins mas que também possuem actividade estrogénica, neste caso indesejada, sendo também conhecidos por estrogéneos inadvertentes (McLachlan, 2005).

Estes xenostrogéneos sintéticos são poluentes que acabam por contaminar os ecossistemas e exercer efeitos de desregulação hormonal nas populações expostas.

Existem centenas de compostos xenostrogénicos poluentes. Para além da necessidade relativa de um anel fenólico, são compostos com estruturas químicas muito diversas e potência estrogénica também muito variável, que se classificam em várias famílias: (McLachlan e Korach, 1995; Olea, Prazos e Exposito, 1998; Safe, 2000; McLachlan, 2005).

- Os pesticidas organoclorados – São compostos que na sua maioria foram banidos dos países industrializados embora tenham sido extensamente usados durante muito tempo, são compostos persistentes no meio ambiente e com capacidade de bioacumulação.
- Os PCB's – Foram usados entre 1929 e 1970 com várias aplicações nomeadamente na indústria eléctrica, como lubrificantes e líquidos de refrigeração; tratam-se de compostos com capacidade de bioacumulação e persistentes no meio ambiente.
- As dioxinas – tratam-se de compostos orgânicos policlorados; são subprodutos da indústria dos pesticidas e de processos de combustão.
- Os alquilfenóis - Na sua grande maioria são compostos usados actualmente na indústria do plástico; o nonilfenol é usado como espermicida e lubrificante vaginal.
- Os alquilfenóis etoxilatos - São usados no fabrico de detergentes, usados sobretudo a nível industrial.
- Os difenilalcanos - Também conhecidos como bisfenóis, são compostos por dois anéis fenólicos unidos por uma cadeia carbonada, usados como monómeros na indústria dos plásticos.

A figura seguinte (figura 1) mostra as estruturas químicas de vários xenostrogéneos naturais e sintéticos, incluindo o 17-β-estradiol.

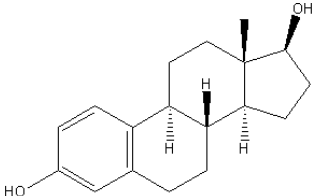
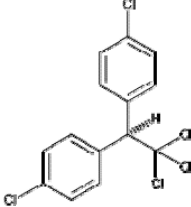
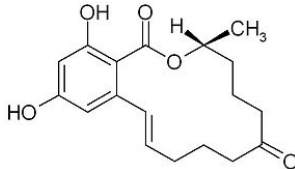
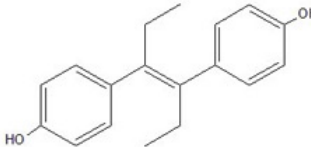
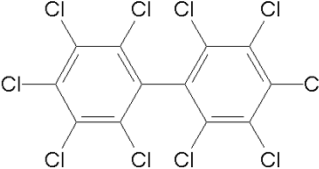
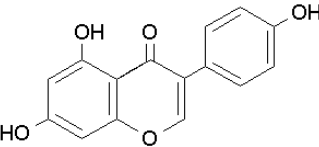
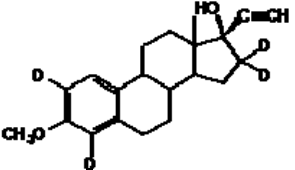
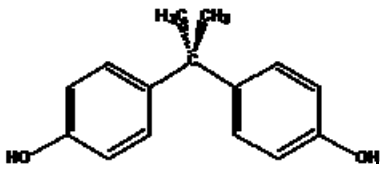
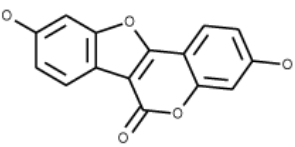
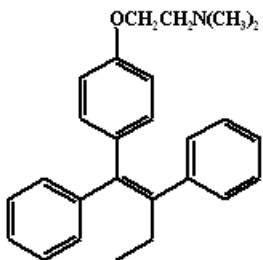
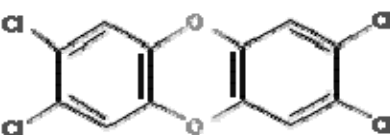
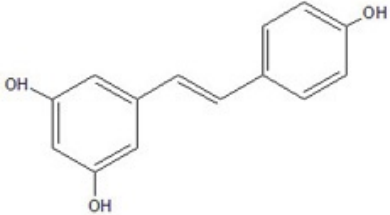
Esteroides	Químicos industriais	Micoestrogéneos
 17-β-estradiol	 Pesticida organoclorado (DDT)	 Zearalenona
Fármacos		Fitoestrogéneos
 Dietilestilbestrol	 PCB	 Genisteína
 Etinilestradiol	 Bisfenol A	 Coumestrol
 Tamoxifeno (antagonista dos estrogéneos)	 Dioxina	 Resveratrol

Figura 1 - Estrutura química de vários compostos capazes de se ligar ao receptor dos estrogéneos

3. BISFENOL A

Os difenilalcanos são uma família de compostos com reconhecidas propriedades estrogénicas, na qual se inclui o bisfenol A com a seguinte estrutura química (figura 2) (Olea, Prazos e Exposito, 1998).

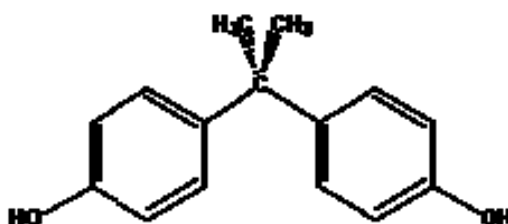


Figura 2 - Estrutura química do bisfenol A

Estruturalmente semelhante ao DES (um composto reconhecidamente teratogénico e carcinogénico para os humanos) o bisfenol A é um dos xenostrogénios poluentes mais ubiqüitários que se conhece (Calafat et al, 2005; Maffini et al, 2006; Wilson et al, 2007).

O bisfenol A é detectado em praticamente todos os tecidos humanos (fígado, medula óssea, testículos, urina, sangue, saliva, sêmen, placenta, cordão umbilical, feto, líquido amniótico e leite) (Maffini et al, 2006) e está altamente disseminado no meio ambiente (Kang, Katayama e Kondo, 2006a).

3.1. *DESCOBERTA DO BISFENOL A*

Este composto foi sintetizado pela primeira vez por Thomas Zincke em 1905, na universidade de Marburg (Alemanha). A sua síntese é conseguida por condensação do fenol com acetona em meio ácido ou básico (BAGIG, 2002; EURAR, 2003).

Em 1938 Dodds e seus colaboradores ao estudarem as propriedades biológicas de vários bisfenóis detectaram as propriedades estrogénicas do bisfenol A. Nesse estudo concluíram que a capacidade estrogénica dos bisfenóis está relacionada com a presença de grupos OH em posição *para*

(Coleman, Toscano e Wiese, 2003). Em 1953 O Dr. Daniel Fox da General Electric e o Dr. Hermann Schnell da Bayer AG descobriram a capacidade do bisfenol A formar ligações cruzadas na polimerização do plástico policarbonato e assim em 1957 (nos EUA) e em 1958 (na Europa) deu-se início à produção industrial de bisfenol A para ser empregue no fabrico de plástico policarbonato (E/E, 2003).

Mais tarde descobriu-se uma nova aplicação do bisfenol A no fabrico de resinas epóxi, usadas actualmente para revestir latas de conserva (Lyons, 2000; BAGIG, 2002).

3.2. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO BISFENOL A

Habitualmente conhecido por bisfenol A, o 2,2-Bis(4-hidroxifenil)propano é sólido à temperatura ambiente encontrando-se geralmente sobre a forma de flocos ou pó com odor ligeiramente fenólico. Tem baixa volatilidade e não aparenta ser persistente no meio ambiente ou bioacumulável. O seu ponto de fusão é de 155-157°C e o ponto de ebulição 250–252°C a 13 mmHg. É um composto moderadamente solúvel em água (300 mg/L) sendo o seu coeficiente de partilha O/A Log Kow = 3,32 (Staples, Dora e Klecka, 1998; EURAR, 2003; Sigma Aldrich, 2005).

3.3. PRODUÇÃO E APLICAÇÕES DO BISFENOL A

Os principais produtores de bisfenol A a nível mundial são os EUA, Europa e Japão. Actualmente quatro companhias produzem bisfenol A na Europa (Bayer, Dow, GE Plastics e Shell) e existem seis locais de produção distribuídos pela Alemanha, Holanda, Bélgica e Espanha. Estima-se que a produção anual europeia seja de cerca de 700 000 toneladas por ano (EURAR, 2003) sendo um dos compostos químicos com maior volume de produção a nível mundial (vom Saal, 2005a).

As principais aplicações do bisfenol A são o fabrico de plástico policarbonato (65%) e o fabrico de resinas epóxi (25%). Outras aplicações menos significativas como a produção de PVC, fabrico de papel térmico, poliuretano, poliamida, líquidos para travões, retardante de chama e selantes dentários

consomem os restantes 10% do bisfenol A produzido anualmente (EURAR, 2003; E/E, 2003; EFSA, 2006).

3.4. VIAS DE EXPOSIÇÃO AO BISFENOL A

A exposição humana ao bisfenol A ocorre sobretudo por via ocupacional, ambiental e alimentar (EURAR, 2003).

- Exposição ocupacional – Ocorre sobretudo em trabalhadores de indústrias de síntese de bisfenol A, síntese de PC e artigos de PC, resinas epóxi, PVC, papel térmico e tetrabromobisfenol A.
- Exposição ambiental - Resulta da contaminação atmosférica, aquática e dos solos com bisfenol A. Esta contaminação ambiental deve-se especialmente à utilização industrial do bisfenol A e à reciclagem de papel térmico (EURAR, 2003; Kang, Katayama e Kondo 2006a). A persistência ambiental do bisfenol A parece ser baixa, pois de uma maneira geral este composto é rapidamente biodegradado (West, Goodwin e Klecka, 2001) quer por acção de microrganismos aquáticos (*Pseudomonas* sp.) quer por fotodecomposição (Kang, Katayama e Kondo, 2006a; 2006b).
- Exposição por via alimentar - resulta da utilização de recipientes de plásticos policarbonato e PVC para contacto com os alimentos ou ainda da utilização de resinas epóxi no revestimento interior de conservas alimentares (EURAR, 2003).

Uma outra via de exposição resulta da utilização de um compósito à base de bisfenol A como selante nos tratamentos dentários (Noda, Komatsu e Sano, 1999; EURAR, 2003).

De entre as várias vias de exposição humana ao bisfenol A anteriormente referidas, a exposição alimentar é a mais preocupante por atingir potencialmente um maior número de pessoas e porque, neste caso a

exposição pode ocorrer durante longos períodos (possivelmente toda a vida) em doses vestigiais e sem ser detectada (EURAR, 2003; Wilson et al 2007).

A exposição por via alimentar ao bisfenol A pode, como foi referido anteriormente, ter duas origens: o uso de recipientes de polycarbonato para armazenar alimentos e o consumo de conservas alimentares revestidas interiormente com resinas epóxi.

Em ambos os casos o bisfenol A é o monómero base para a síntese de materiais que contactam directamente com os alimentos.

Vários estudos demonstram a migração de bisfenol A a partir de recipientes de polycarbonato (Krishnan et al, 1993; Biles e McNeal, 1997; Howe e Borodinsky, 1998; Howdeshell et al, 2003) e de latas de conserva revestidas com resinas epóxi. (Biles, McNeal e Begley, 1997; Goodson, Sommerfield e Cooper, 2002; Braunrath e Chichna, 2005; Thomson e Grounds, 2005).

A Association of Plastic Manufacturers in Europe (APME) estima uma ingestão diária de bisfenol A de 0,48 a 1,6 µg/kg/dia (APME, 2003); uma outra fonte da indústria estima que a ingestão diária de bisfenol A não ultrapassa os 0,12 µg/Kg/dia (BAGIG, 2002). Estes valores estão nitidamente abaixo dos valores estimados pela European Food Safety Authority (EFSA) em 2006. De acordo com a última avaliação da segurança do bisfenol A (EFSA, 2006) a potencial exposição através da dieta a este composto varia entre 0,2 e 11 µg/kg/dia para lactentes com menos de 3 meses; entre 8,3 e 13 µg/kg/dia para crianças com 6 meses de idade; é de 5,3 µg/kg/dia para crianças com 1,5 anos e será de 1,5 µg/kg/dia nos adultos.

Actualmente a Environmental Protection Agency (EPA) refere que a exposição ao bisfenol A está muito abaixo dos níveis geralmente considerados seguros, pelo que considera não haver razões para preocupação (Gray e Cohen, 2004). Também a EFSA considerou em 2006 que os níveis de exposição da população são baixos.

3.5. BIOMONITORIZAÇÃO DO BISFENOL A

Vários estudos demonstram como é ubíqua a exposição humana ao bisfenol A, tendo sido detectada a presença deste composto em diversas amostras biológicas no Homem (Matsumoto et al, 2003; Yang et al, 2003; Sun et al, 2004; Calafat et al, 2005; Engel et al, 2006; Kuruto-Niwa et al, 2006; Wilson et al, 2006).

Num estudo realizado em 2004 (Kawaguchi et al.) foi detectado bisfenol A na urina, plasma e saliva humana. Um outro estudo realizado numa população de adultos dos EUA mostrou que 95% das amostras de urina continham bisfenol A ($1,33 \mu\text{g/L}$) (Calafat et al, 2005).

No estudo de Ouchi et al. (2002) foram detectados níveis de bisfenol A glucoronconjugado com valores entre 0,2 e 19,1 ng/mL em urina; Yang M. et al (2003) detectaram valores de bisfenol A na ordem dos 9,5 ng/mL na urina de uma população coreana.

Em 2002 Ikezuki Y. e colaboradores detectaram a presença de bisfenol A em fluido folicular, soro fetal, e líquido amniótico. O bisfenol A também foi detectado em leite humano ($0,61 \pm 0,2 \text{ ng/mL}$) (Sun 2004), colostro ($3,41 \pm 0,13 \text{ ng/mL}$) (Kuruto-Niwa et al, 2006), sangue materno ($0,46 \pm 0,2 \text{ ng/mL}$) e sangue do cordão umbilical ($0,62 \pm 0,13 \text{ ng/mL}$) (Kuroda et al, 2003). Estudos recentes revelam a presença deste composto no líquido amniótico ($0,5 \text{ ng/mL}$) (Engel et al, 2005).

Dada a rápida metabolização deste composto (ver 3.6 - Toxicocinética) estes dados sugerem que existe uma exposição contínua da população humana ao bisfenol A, provavelmente resultante de várias fontes.

3.6. TOXICOCINÉTICA DO BISFENOL A

O bisfenol A após administração oral é rápida e extensamente absorvido (Völkel et al, 2002).

Estudos realizados em animais revelam que o bisfenol A após administração oral ou subcutânea atinge concentrações sanguíneas mais elevadas nos primatas que nos ratos (Tominaga et al, 2006). A biodisponibilidade após

administração oral é inferior à biodisponibilidade por via subcutânea. (Pottenger et al, 2000, Tominaga et al, 2006).

Há estudos que demonstram que o bisfenol A sofre extenso efeito de 1ª passagem hepática (Völkel et al, 2002; EURAR, 2003; Tominaga et al, 2006). É metabolizado a nível hepático por glucoronidação e em menor extensão por sulfoconjugação, apresentando os metabolitos menos potencial estrogénico que o composto original (Elsby et al, 2001; Matthews, Twomey e Zacharewski, 2001; Zalko et al, 2003). A glucoronidação é mediada no rato pela UGT sendo mais lenta durante a gestação e no fígado fetal devido a baixos níveis desta enzima (Kang, Katayama e Kondo, 2006a). A sulfoconjugação é mediada por sulfotransferases (SULT1A1 e ST1A3) (Kang, Katayama e Kondo, 2006a).

Kim e colaboradores (2003) relatam um nível de metabolitos glucoronoconjugados superior na urina de homens e um maior nível de metabolito sulfocojugado na urina de mulher; aparentemente a mulher tem um taxa de eliminação mais lenta do que o homem.

A nível hepático pode ainda ocorrer oxidação a bisfenol-O-quinona pelo CyP450 (EURAR, 2003) e este metabolito oxidado pode ligar-se ao DNA (Atkinson e Roy 1995; Ben-Jonathan e Steinmetz, 1998; Edmonds et al, 2004); no entanto o bisfenol A exibe actividade inibidora do CyP450 no rato (Hanioka et al, 1998) e no Homem (Kang, Katayama e Kondo 2006a).

O bisfenol A apresenta uma extensa distribuição, tendo sido detectado em diversos órgãos (fígado, medula óssea, testículos, placenta, cordão umbilical e feto); tem ainda a capacidade de atravessar a placenta (Schönfelder et al, 2001; Ikezuki et al, 2002; Engel et al, 2005; Tsutsumi, 2005) e é excretado no leite materno (Snyder et al, 2000; Sun et al, 2002; Kuruto-Niwa et al, 2006).

O bisfenol A parece ter baixo potencial para bioacumulação (Lyons, 2000) e não se acumula nem no tecido adiposo nem no endométrio (EURAR, 2003). Segundo alguns autores (Nagel et al, 1997; Sheenan, 2000) o bisfenol A parece ter uma taxa de ligação às proteínas plasmáticas inferior à dos estrogéneos naturais, logo a concentração livre no sangue será maior; este facto pode também explicar a sua potência estrogénica in vivo ser superior ao previsto tendo em conta a sua actividade estrogénica in vitro (Nagel, vom Saal e Welshon, 1999).

As principais vias de excreção são as fezes e a urina (EURAR, 2003). Os estudos de toxicocinética em ratos apontam para uma maior importância da excreção fecal, devido à circulação enterohepática que se observa nos roedores (Völkel et al, 2002); no entanto nos primatas, incluindo o Homem, a circulação enterohepática não ocorre (Völkel et al, 2002) parecendo ser a excreção renal a principal via de eliminação (Tominaga et al, 2006).

Dado que a maioria dos estudos são feitos em animais é necessário considerar que existem naturalmente diferenças a nível da capacidade metabólica, entre as diversas espécies, que dificultam as extrapolações para o Homem.

Segundo a EFSA (EFSA, 2006) existem diferenças significativas no que diz respeito à toxicocinética do bisfenol A em roedores e em primatas, incluindo os humanos. Essas diferenças resultam sobretudo de uma eliminação mais lenta nos roedores que origina uma AUC de bisfenol A livre, inferior nos primatas (EFSA, 2006).

Os dados relativos à toxicocinética do bisfenol A foram obtidos a partir de estudos em adultos sendo por isso necessário considerar que durante a vida fetal e pós-natal a toxicocinética dos químicos é muito diferente do adulto (Welshons et al, 2001;2003) O feto humano poderá ser incapaz de destoxificar eficazmente o bisfenol A devido à sua imaturidade enzimática (Elsby et al, 2001).

3.7. EFEITOS TÓXICOS DO BISFENOL A

Um estudo realizado em 1993 revelou que uma substância estrogénica se libertava de recipientes de polycarbonato (Krishnan et al, 1993), essa substância foi posteriormente identificada como bisfenol A. Esta descoberta abriu as portas à polémica sobre os possíveis efeitos da exposição humana ao bisfenol A.

- *Estrogenicidade*

A capacidade estrogénica do bisfenol A tem sido confirmada por vários investigadores em estudos in vitro (Gaido et al, 1997; Schafer et al, 1998; Rivas et al, 2002; Coleman, Toscano e Wiese, 2003; Li et al, 2004; Terasaka et al,

2004; Recchia et al, 2004) e in vivo (Ashby e Tinwell, 1998; Howdeshell et al. 1999).

- O bisfenol A tem capacidade para se ligar ao receptor ER (Coleman, Toscano e Wiese, 2003).
- Estimula o crescimento de células MCF7 (linha celular cancro mama) (Rivas et al, 2002; Recchia et al, 2004)
- Dá resultados positivos no ensaio uterotrófico no rato (Ashby e Tinwell, 1998)
- Acelera o aparecimento da puberdade em ratinhos (Howdeshell et al, 1999).
- A sua acção é revertida pelo tamoxifeno (antagonista dos estrogéneos) (Stroheker et al, 2004).
- Estimula a expressão de calbidina-D_{9k} em vários tecidos do rato (Hong et al, 2003; 2004).

O bisfenol A demonstra propriedades estrogénicas in vitro e in vivo, sendo cerca de 3-5 vezes menos potente que o 17- β -estradiol (estrogéneo de referência). É considerado um estrogéneo fraco (Chen, Ike e Fujita, 2001) embora nem todos os autores concordem com esta classificação (Milligan et al, 1998, vom Saal e Hughes, 2005b).

O bisfenol A liga-se mais eficazmente ao ER β no entanto induz expressão genética mediada quer pelo ER α quer pelo ER β (Matthews, Twomey e Zacharewsky, 2001), mas nem todos os efeitos do bisfenol A são mediados pelos clássicos receptores estrogénicos nucleares (ER α , ER β); o bisfenol A pode também interagir com receptores estrogénicos da membrana, da mitocôndria ou com receptores de outros eixos hormonais (Gould et al, 1998; Rosselli et al, 2000; vom Saal 2005a; Watson et al, 2005; Welshons, Nagel e vom Saal, 2005).

- *Toxicidade aguda*

Embora não existam dados em humanos, vários estudos em animais confirmam que o bisfenol A apresenta baixa toxicidade aguda por via oral. A DL₅₀ em ratos, murganhos e coelhos é superior a 2 g/kg (EURAR, 2003).

Os estudos efectuados mostram também que o bisfenol A não tem propriedades corrosivas nem irritantes na pele, embora seja irritante para a conjuntiva ocular. A nível respiratório causa irritação moderada (EURAR, 2003).

- *Toxicidade após exposição repetida*

Os estudos realizados em animais de laboratório com exposição repetida ao bisfenol A revelam apenas uma diminuição do peso, alterações hepáticas e inflamação do epitélio respiratório (EURAR, 2003).

- *Mutagenicidade e carcinogenicidade*

No que diz respeito à mutagenicidade e carcinogenicidade deste composto os estudos não são concordantes. O bisfenol A em diferentes ensaios não demonstrou propriedades mutagénicas (EURAR, 2003; Chen, Ike e Fujita, 2001), havendo no entanto um estudo (Takahashy et al, 2001) que revela mutagenicidade em células RSa humanas (células fibroblásticas de embrião humano). Alguns autores sugerem a possibilidade de se formar um metabolito activo (bisfenol A 3,4-quinona) capaz de se ligar ao DNA (Atkinson e Roy, 1995; Ben-Jonathan e Steimetz, 1998; Edmonds et al, 2004). Por outro lado há um outro estudo que demonstra que o bisfenol A é capaz de formar micronúcleos in vitro (Pfeiffer et al, 1996) e que demonstra ser um potencial aneugénico in vitro (EURAR, 2003). Outros estudos revelam que o bisfenol A interfere na formação dos microtúbulos (Ben-Jonathan e Steimetz, 1998; EURAR, 2003; Lehmann e Metzler, 2004).

O EURAR considera que o bisfenol A tem potencial mutagénico pouco significativo.

A estrogenicidade é um importante mecanismo hormonal de carcinogénese mas não é por si só suficiente para explicar a actividade carcinogénica de todos os estrogénios (Kanai et al, 2001). Os estudos acerca da carcinogenicidade do bisfenol A demonstram aumentos não significativos de leucemias e linfomas em diferentes espécies de roedores (Huff, 2001). Num destes estudos detectou-se um aumento de leucemias em ambos os sexos no rato F344 e um aumento do fibroadenoma da glândula mamária no rato macho; para além disso no ratinho (B6C3F1) macho foi observado um aumento de linfomas/leucemias (Huff, 2001).

Com base neste estudo o EURAR considera o potencial carcinogénico do bisfenol A baixo e o NTP considera o efeito carcinogénico do BPA equívoco no rato (macho e fêmea) e no murganho macho. Haighton e colaboradores analisaram os estudos relativos à genotoxicidade e carcinogenicidade do bisfenol A concluindo que este não apresenta risco carcinogénico para humanos (Haighton, 2003). No entanto o autor do estudo original (Huff, 2001; 2003) discorda e sugere que o bisfenol A pode estar associado a um aumento dos tumores do sistema hematopoiético.

Um estudo recente (Murray et al, 2006) em ratinhos revela uma associação entre a exposição fetal ao bisfenol A e o cancro da mama (para doses entre 2,5 e 1000 µg/kg/dia).

Actualmente o bisfenol A está classificado pela IARC como provavelmente não carcinogénico para o Homem (Grupo 4).

- *Efeitos imunotóxicos*

Tem sido discutida a acção de alguns químicos ambientais, particularmente xenostrogénios no sistema imunitário (Inadera, 2006). Um estudo de Byun e colaboradores (2004) revela que o bisfenol A diminui a secreção de TNF- α e altera a actividade dos macrófagos em ratinhos.

- *Efeitos relacionados com stress oxidativo*

Vários estudos avaliaram a relação do bisfenol A com o stress oxidativo. (Kabuto et al, 2003; Chitra et al, 2003; Bindhumol, Chitra e Mathur, 2003; Kabuto et al, 2004). Doses baixas (0,2-20 µg/kg) de bisfenol A administrado oralmente a ratos induzem um aumento de espécies reactivas de oxigénio no fígado (Bindhumol, Chitra e Mathur, 2003) e no epidídimo (Chitra et al, 2003). O aumento de espécies reactivas de oxigénio no ratinho foi associado a um subdesenvolvimento cerebral, renal e testicular (Kabuto et al, 2004)

- *Efeitos no desenvolvimento*

As principais preocupações acerca dos DE, e do bisfenol A em particular, relacionam-se com os efeitos observados no desenvolvimento do feto/embrião, pois nesta fase os órgãos são especialmente sensíveis a baixas concentrações de hormonas esteroides e da tiróide (Bigsby et al, 1999).

Todo o desenvolvimento biológico é controlado por vários sistemas de mensageiros químicos (hormonas, neurotransmissores e factores de crescimento, entre outros) que controlam tudo desde o sexo de um bebé até ao seu número de dedos e as suas capacidades intelectuais (Myers, 2002).

Desde 1940 ocorre de forma generalizada a exposição humana a xenobióticos durante fases críticas do desenvolvimento (Colborn, 1995). Os efeitos nesta fase são particularmente preocupantes pois o embrião, o feto ou a criança recém-nascida são muito sensíveis aos mensageiros químicos (Guillette e Gunderson, 2001) e consequentemente à sua desregulação. Para além disso os cientistas concordam que nesta fase os efeitos podem ser permanentes e irreversíveis (Colborn, vom Saal e Soto, 1993; Bigsby et al, 1999; Myers, 2003; McLachlan, 2005).

Vários estudos já confirmaram que a exposição de animais do sexo masculino in utero, aos estrogéneos está associada a várias alterações no desenvolvimento como criptorquidismo, retenção dos ductos de Müller, hipospadias e quistos no epididímo (Safe, 1993; McLachlan, 2005). Mas muitas vezes os efeitos no desenvolvimento ocorridos em fases precoces

(embrião/feto) só se observam mais tarde na vida, sendo difícil associá-los a essa exposição (Bigsby et al, 1999).

No que diz respeito ao bisfenol A o primeiro estudo de toxicidade a nível do desenvolvimento foi feito em 1987 (Morrisey et al, 1987). Nesse estudo não foi detectada nenhuma evidência de malformação quer no rato quer no ratinho para as doses estudadas (160; 320; 640 mg/kg/dia no rato e 500; 750; 1000 e 1250 mg/kg/dia no ratinho). Estudos posteriores com doses baixas também não detectaram efeitos no desenvolvimento (Cagen et al, 1999a; 1999b; Witorsch, 2002), há no entanto vários que demonstram efeitos em diversas fases do desenvolvimento:

- Doses baixas de bisfenol A detectadas em meios aquáticos parecem interferir com a diferenciação sexual em rãs e gastrópodes (Lyons, 2000).
- Aumento do volume prostático em ratinhos expostos in útero a doses de bisfenol A de 2 e 20 µg/Kg/dia (Nagel et al, 1997). Este estudo foi reproduzido por Cagen (Cagen et al, 1999a) não tendo sido detectados efeitos no volume prostático.
- Aumento das glândulas prepuciais e redução do epidídimo observada após exposição in utero do ratinho a doses baixas (2 µg/Kg) de bisfenol A (vom Saal et al, 1998).
- Aumento dos ductos prostáticos dorsolaterais e malformações na uretra em ratinhos expostos fetalmente a 10 µg/kg/dia (efeitos semelhantes foram relatados para o DES) (Timms et al, 2005).
- Aumento do peso prostático e redução do peso do epidídimo (Gupta, 2000a). Este estudo revela que o bisfenol A é capaz de produzir estas alterações por interacção directa com os órgãos reprodutores fetais sem interferir com o sistema endócrino da mãe ou do feto, tendo a validade dos resultados sido questionada por outros autores (Elswick, Miller e Welsh, 2000; Gupta, 2000b).
- Atraso no desenvolvimento fetal para doses da 1000 mg/kg (no entanto este estudo não observou qualquer sinal de dismorfogénese fetal) (Kim et al, 2001).

- Alteração do epitélio vaginal do ratinho exposto in útero ao bisfenol A (0,2 mg/kg) (Schönfelder et al, 2005).
- Alteração da organização tecidular da glândula mamária e tracto reprodutor em ratinhos CD-1 fêmeas expostas durante a gestação a doses subcutâneas de bisfenol A de 0,5 e 10 mg/kg/dia (Nikaido et al, 2004).
- Diminuição do peso vaginal e cornificação persistente da vagina (Kato et al, 2003).
- Alteração do desenvolvimento peripubretal da glândula mamária no ratinho exposto in útero ao bisfenol A (25 ng/kg) os autores consideram que este pode ser um factor de susceptibilidade aumentada ao cancro da mama (Muñoz-de-Toro et al, 2005).
- Alteração das estruturas sexuais dimórficas no SNC nomeadamente em núcleos hipotalâmicos (1,5 mg/Kg/dia) (Kubo et al, 2001; Funabashi et al, 2004).
- Alteração do desenvolvimento do sistema dopaminérgico central (área límbica) no ratinho exposto durante o período pré e pós-natal (Narita et al, 2006).
- Aneuploidia meiótica que pode ser responsável por malformações congénitas (Hunt et al, 2003), possivelmente por alteração das concentrações intracelulares de cálcio nos oócitos (Mohri e Yoshida, 2005).

- *Efeitos na fertilidade*

A função reprodutora na maioria dos invertebrados e em todos os vertebrados é controlada por uma rede intrincada de mensageiros químicos (o sistema endócrino). Este sistema baseia-se na libertação de hormonas altamente específicas, para as quais o organismo apresenta grande sensibilidade. Naturalmente os químicos ambientais que mimetizam ou bloqueiam a acção hormonal podem alterar este frágil equilíbrio (Rosselli et al, 2000; McLachlan, 2005).

Relativamente à alteração da fertilidade após exposição ao bisfenol A, embora haja estudos que não tenham detectado qualquer efeito (Nagao et al, 1999;

Ema et al, 2001; Kato et al, 2005), noutros estudos foram observados as seguintes alterações:

- Inibição do fenótipo masculino e da espermatogénese em pintos expostos a doses baixas (2 µg/Kg) administradas oralmente a partir da 2ª semana de vida (Furuya et al, 2006).
- Redução da produção de esperma em ratos (1–100 µg/dia) (Toyama e Yuasa, 2004; Maffini et al, 2006).
- Puberdade precoce em ratinhos (2,4 µg/Kg) (Howdeshell et al, 1999).
- Alteração dos ciclos estrogénicos e dos órgãos reprodutores femininos (Kato et al, 2003, Maffini et al, 2006).
- Aumento da proliferação das glândulas do endométrio (Maffini et al, 2006).

- *Efeitos no comportamento*

Os estrogéneos endógenos são cruciais na diferenciação sexual durante o período perinatal e na modulação no adulto de muitas funções neuroendócrinas e comportamentos sobretudo associados à reprodução (Wooley, 1999; Belcher e Zsarnovszky, 2001). Por exemplo os bebés do sexo masculino nos 3 primeiros meses de vida têm concentrações de hormonas masculinas mais elevadas (cerca de 50% dos níveis detectados no adulto); a razão deste fenómeno é desconhecida no entanto pensa-se que seja um processo importante para definir certos padrões do comportamento masculino (Lyons, 2000).

Os estudos sugerem que o SNC é particularmente sensível aos DE durante fases precoces do desenvolvimento, podendo ser até mais sensível que os órgãos reprodutores.

Um outro aspecto diz respeito à possível interacção do bisfenol A com os receptores da tiróide. Há estudos que demonstram a capacidade do bisfenol A para antagonizar o efeito da hormona T3 (tri-iodotironina) (Zoeller, 2005). Uma vez que as hormonas da tiróide são essenciais durante o desenvolvimento do SNC, é natural que, se o bisfenol A interfere com o receptor da tiróide, possa ter efeitos a esse nível, nomeadamente no comportamento.

Vários estudos confirmam o efeito do bisfenol A no sistema nervoso e no comportamento sexual e social dos animais. Entre os efeitos observados no comportamento de animais expostos ao bisfenol A em vários períodos do desenvolvimento, destacam-se os seguintes:

- Alteração da normal diferenciação sexual do locus coeruleus e comportamento em ratos expostos durante a gestação e aleitamento (1,5 mg/Kg) (Kubo et al, 2001).
- Alteração da diferenciação dos núcleos hipotalâmicos e da área preóptica no SNC em ratos após exposição pósnatal (Patisaul, Fotino e Polton, 2006).
- Hiperactividade no rato Wistar devido a alteração da expressão do gene da proteína transportadora da dopamina (8,7 nmol/ μ)(Ishido et al, 2005).
- A exposição pré-natal de ratos ao bisfenol A em doses baixas (15 μ g/kg/dia) inibe a diferenciação sexual do comportamento exploratório e aumenta os comportamentos depressivos (Fujimoto, Kubo e Aou, 2006).
- Alteração do comportamento exploratório e sexual de ratos machos após administração oral de bisfenol A (40 μ g/kg/dia) na puberdade (Della Seta et al, 2006).
- Diminuição da motivação exploratória no rato macho e da actividade motora no rato fêmea, quando expostos durante a gestação a doses baixas de bisfenol A (5,32 e 52,3 μ g/mL) (Farabollini, Porrini e Dessi-Fulgheri, 1999).
- Alteração do comportamento das crias de ratos F344 expostas ao bisfenol A durante o fim da gestação (4 mg/Kg/dia) (Negishi et al, 2003).
- Inversão das normais diferenças comportamentais nos ratos machos e fêmeas quando expostos durante a gestação e aleitamento a doses de 0,1 mg/L de bisfenol A (Kubo et al, 2003).
- Alteração de comportamentos sexualmente dimórficos não relacionados com a reprodução, após exposição a doses

- Diminuição de certos componentes do comportamento materno em ratinhos expostos durante a gestação e após o nascimento, a doses baixas de bisfenol A (10 µg/kg/dia) (Palanza et al, 2002) (40 µg/kg/dia) (Della Seta et al, 2006).
- Alteração do comportamento de acasalamento em roedores monogâmicos (*Mongolian gerbils*) expostos diariamente a doses orais baixas de bisfenol A (2 ou 20 µg/kg) (Razzoli, Valsecchi e Palanza, 2004).
- Alteração do comportamento sócio-sexual nos ratos fêmeas expostos durante a gestação e aleitamento a doses baixas de bisfenol A (40 µg/kg/dia) (Porrini et al, 2004).

De acordo com a reavaliação da segurança do bisfenol A feita pela EFSA (EFSA, 2006) os vários estudos que apresentam efeitos no comportamento revelam inconsistências e até, por vezes, resultados contraditórios. Pelo que não foram considerados os valores de NOAEL assim obtidos para estabelecer a actual TDI. No entanto a EFSA sugere que devem ser feitos estudos mais abrangentes para avaliar os efeitos do bisfenol A em doses baixas na dimensão do locus coeruleus (EFSA, 2006).

3.8. *POLÉMICA EM TORNO DOS EFEITOS DO BISFENOL A EM DOSES BAIXAS*

Gerou-se um aceso debate em torno do bisfenol A, de um lado estão cientistas e activistas que reclamam para este composto efeitos comprometedores em baixas doses e do outro estão as autoridades reguladoras e cientistas (alguns com filiação na indústria) que não reconhecem razões para preocupação.

Esta polémica em torno do bisfenol A tem várias vertentes por vezes complexas. Em primeiro lugar as doses a que estamos expostos habitualmente são muito baixas, no entanto existe um número considerável de estudos que revelam efeitos inesperados mesmo para doses baixas, o que levou à formulação da “low dose hypothesis” que divide a comunidade científica.

(Sheenan, 2000; Witorsh, 2002; Gray e Cohen, 2004; Purchase, 2004; Owens, Chaney e Weigh 2005; vom Saal et al, 2005a; 2005b; 2005c; Dash, Marcus e Terry, 2006).

Consideram-se efeitos “low-dose” aqueles que se observam em estudos que utilizam doses inferiores às usadas nos estudos de toxicologia tradicional (doses inferiores à actual TDI – 50 µg/Kg/dia).

Esta hipótese sugere que os efeitos do bisfenol A não seguem a tradicional curva dose-resposta monotónica, mas sim uma curva em U, ou seja que para doses baixas (na ordem de grandeza a que estamos geralmente expostos) este composto possa ter efeitos inesperados que não se observam para doses mais elevadas (Bigsby et al, 1999; Witorsch, 2002).

Os estudos que demonstram diversos efeitos nocivos do bisfenol A para doses muito baixas são difíceis de reproduzir o que também tem lançado grande discussão no meio científico (Feldman, 1997; Sheenan, 2000; Myers, 2002; McGowan, 2003; Purchase, 2004; vom Saal, 2005a; 2005b).

Alguns cientistas e activistas sustentam que a entidade financiadora dos estudos condiciona a obtenção de resultados (E/E, 2003).

O NTP em 2001 conclui que há evidência credível dos efeitos do bisfenol A em doses baixas embora esses efeitos não estivessem conclusivamente definidos, mas uma avaliação feita pelo Harvard Center for Risk Analysis concluiu em 2002 não existir evidência consistente dos efeitos do bisfenol A para doses inferiores à actual TDI (50 mg/kg/dia) (Gray e Cohen, 2002).

Um estudo interessante demonstra como os resultados positivos e negativos obtidos sobre o bisfenol A parecem depender de dois factores: espécie animal usada e proveniência dos fundos que financiam o estudo(vom Saal et al, 2005a; 2005c). Neste estudo foi feita uma extensa revisão bibliográfica sobre os estudos com bisfenol A e concluiu-se que 90% dos estudos financiados pelo governo detectam efeitos positivos e nenhum dos estudos financiados pela indústria detecta esses mesmos efeitos. vom Saal e colaboradores vão mais longe sugerindo que deve ser feita uma nova avaliação do risco do bisfenol A com base em:

- Extensa literatura que reporta efeitos em animais para doses inferiores a 50 µg/kg/dia (actual TDI).

- Elevada taxa de libertação de bisfenol A a partir de recipientes em contacto com alimentos (responsável pela generalizada exposição humana) (Sun et al, 2000; Brede, Fjedal e Herikstad, 2003; Wong, Leo e Seah, 2005).
- Relatos da presença de bisfenol A em várias amostras biológicas, nomeadamente sangue fetal, em níveis superiores aos que causam efeitos em ratinhos (Kuruto-Niwa et al, 2006; Wilson et al, 2006).
- Dados epidemiológicos recentes sugerem uma relação entre a exposição ao bisfenol A e determinadas doenças na mulher (Takeuchi et al, 2004).

Um outro ponto de discórdia é a extrapolação dos resultados para o Homem. Esta extrapolação é difícil porque os estudos são feitos em animais e naturalmente há diferenças interespecie decorrentes de diferenças nas vias metabólicas e a dimensão do fígado, bem como a diferente sensibilidade de cada espécie (E/E, 2003); há ainda a referir as diferenças intraespécie resultantes de diferentes fenótipos enzimáticos e ainda a diferente sensibilidade de cada tecido num mesmo organismo (WHO, 2002).

Um dos poucos estudos que relacionam a exposição de bisfenol A com efeitos em humanos (Takeuchi et al, 2004) observa uma relação positiva entre os níveis séricos de bisfenol A, obesidade e síndrome dos ovário poliquístico em mulheres, possivelmente associada a alteração da concentração de androgéneos.

A indústria e as entidades reguladoras continuam a dizer que o peso da evidência não é suficiente para sustentar a hipótese do bisfenol A poder provocar efeitos tóxicos em doses baixas (BAGIG, 2002; E/E, 2003; CSTEE, 2002).

A verdade é que existe um grande interesse comercial no bisfenol A sobretudo por parte do sector dos plásticos, que teria muito a perder com a restrição do uso deste composto.

No comunicado emitido pela EPA em 2002 (EPA, 2002) é focada a necessidade de realização de mais estudos para clarificar a hipótese de efeitos em doses baixas.

A análise feita pela EFSA aos estudos disponíveis até 2006 conclui que os efeitos do bisfenol A em doses baixas não são suficientemente robustos para serem usados na avaliação do risco deste composto.

4. PLÁSTICO POLICARBONATO

4.1. CARACTERÍSTICAS DO PLÁSTICO POLICARBONATO

Actualmente o PC é sem dúvida a principal aplicação do bisfenol A, sendo cerca de 486 880 toneladas de bisfenol empregues anualmente no fabrico de policarbonato (Lyons, 2000; EURAR, 2003; EFSA, 2006).

O PC é um polímero obtido pela condensação de uma molécula de bisfenol A com diclorocarbonilo (figura 3) ou acetona.

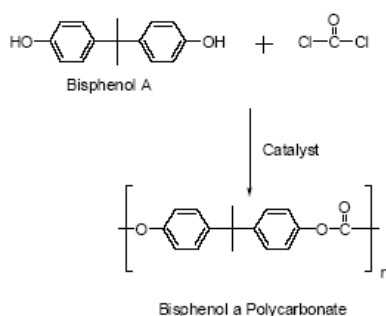


Figura 3 – Síntese do policarbonato a partir de bisfenol A

Este polímero apresenta características extremamente atractivas que o tornam um material de excelência no fabrico dos mais diversos utensílios. É leve, transparente, resistente ao choque e a variações de temperatura (desde -40 a 145°C) (Coutinho e Habibe, 2002). É utilizado para fabricar lentes de óculos,



Figura 4 – Biberões de policarbonato

dispositivos médicos, CD's, DVD's, equipamento eléctrico, telémoveis e inclusive recipientes de plástico reutilisáveis destinados a contactar com alimentos como é o caso dos biberões (figura 4) (Lyons, 2000; BAGIG, 2002).

4.2. MIGRAÇÃO DE BISFENOL A

O polímero de PC após síntese é extremamente estável, no entanto, estudos revelam que pode ocorrer hidrólise sob certas condições de temperatura e pH com consequente libertação de compostos químicos (Krishnan et al, 1993; Howe e Borodinski, 1998; Ben-Jonathan e Steimetz, 1998; EURAR, 2003; Sajiki, 2003).

No caso da utilização do PC no fabrico de recipientes que contactam com alimentos, vários compostos podem migrar para os mesmos [fenol, p-terc-butilphenol, 2,4-di-terc-butilfenol, Cyasorb UV5411, bis(2-etilhexilftalato), Irganox 1076 e Irgafos 168] (Nerin et al, 2002). No entanto aquele que tem suscitado maior preocupação é o bisfenol A.

A migração consiste num processo de difusão que depende das características do alimento assim como do material que compõe o recipiente (Garcia et al, 2006).

A descoberta de que o bisfenol A poderia migrar a partir de recipientes de PC foi feita acidentalmente (Krishnan et al, 1993) quando se verificou que recipientes de PC quando autoclavados libertavam um composto com propriedades estrogénicas.

A ligação éster existente no policarbonato pode sofrer hidrólise (Welshons, Nagel e vom Saal, 2005).

Para além da possível hidrólise do polímero também ocorre migração de resíduos de bisfenol A resultantes da polimerização incompleta durante o fabrico do PC (EURAR, 2003; Maffini et al, 2006; EFSA, 2006). Em qualquer dos casos, tratando-se de recipientes de PC destinados a contactar com alimentos pode ocorrer migração do bisfenol A para os alimentos.

A reutilização de materiais de plástico vai progressivamente degradá-los, influenciando as suas características. O PC reutilizado 15 vezes é menos

hidrofóbico que o PC novo (Jetten e Kruijf, 2002), o que pode facilitar a migração de bisfenol A em recipientes de polycarbonato usados.

4.2.1. DETERMINAÇÃO DA MIGRAÇÃO ESPECÍFICA DE BISFENOL A A PARTIR DE RECIPIENTES DE POLICARBONATO

Quando se pretende determinar a migração específica de uma substância do plástico para um alimento, o primeiro passo consiste na exposição do alimento, simulador de alimento ou meio de teste ao plástico em causa (EN 13130-1, 2000). Um simulador de alimentos é um meio que irá mimetizar os efeitos do alimento no plástico (NE 13130-1, 2000). De acordo com a directiva 85/572/EEC (EEC 1985) existem 4 tipos de simuladores de alimentos: água destilada ou de qualidade equivalente (simulador A); ácido acético 3% (simulador B); etanol 15% (simulador C) e azeite rectificado (simulador D); este último pode no entanto ser substituído, em certos casos, por outros simuladores de características oleosas.

Esta directiva (EC 1985) apresenta ainda uma tabela com os vários simuladores que devem ser utilizados nos testes de migração como substitutos de determinados alimentos.

As condições de tempo e temperatura para exposição do plástico ao simulador ou ao alimento vêm referidas na NE 13130 - Parte 1 (EN 13130-1, 2002) e na NE 14350 – Parte 2 (EN 14350-2, 2004) para o caso particular dos biberões de polycarbonato.

O segundo passo na determinação da migração específica de uma substância do plástico para um alimento consiste na detecção da substância em causa no simulador ou alimento.

São vários os estudos que pretendem detectar a presença de bisfenol A em alimentos ou simuladores de alimentos em contacto com recipientes de polycarbonato, sobretudo biberões:

- Biles et al, (1997) detectaram a migração de bisfenol A em simuladores de alimentos, a partir de biberões e recipientes para

água fabricados em PC quando sujeitos a diferentes condições de temperatura.

- Mountfort et al, (1997) testaram 24 marcas de biberões. Os biberões foram esterilizados (com água a ferver, lavagem na máquina ou esterilização química) de seguida foram cheios com água e leite em pó para bebés, e foi posteriormente aquecido no microondas durante 30 segundos. Não foi detectada migração de bisfenol A em nenhuma das análises efectuadas (LD = 30 ppb).
- Howe S.R. e Borodinsky L., (1998) estudaram a migração de bisfenol A a partir de discos de policarbonato, para vários simuladores (aquosos e oleosos) não tendo detectado migração, mesmo para condições de teste severas (LD = 5 ppb).
- Sun Y. et al, (2000) detectaram níveis de bisfenol A entre 0,59 e 0,75 ppb em biberões novos em contacto com água a 95°C durante 30 minutos (LD = 0,38 ppb).
- Brede C. et al, (2003) avaliaram a migração de bisfenol A a partir de biberões em contacto com água a 95°C durante 30 minutos. Nos biberões novos observaram uma migração média de $0,23 \pm 0,12$ ppb; para biberões usados, submetidos a 51 e 169 ciclos da lavagem observaram respectivamente $8,4 \pm 4$ ppb e $6,7 \pm 4$ ppb de bisfenol A (LD = 0,1 ppb).
- Howdeshell K. et al, (2003) observaram que o bisfenol A pode migrar do PC para água à temperatura ambiente.
- Wong K.O., Leo L.W. e Seah H.L., (2005) avaliaram a migração de bisfenol A em 28 marcas de biberões de PC, para dois simuladores (etanol 10% a 70°C e óleo de milho 100°C) em qualquer dos casos foi detectado bisfenol A ($0,64 \pm 0,48$ µg/in² e

0,43 ± 1,25 $\mu\text{g}/\text{in}^2$ respectivamente) Verificaram ainda que a migração de bisfenol A aumenta com o tempo de contacto entre o recipiente e o alimento (LD = 3 ppm).

- Num estudo realizado pelo Dutch Food and Consumer Product Safety Authority (2005) foram analisadas 22 marcas de biberões. Nas condições operadas não foi observada migração de bisfenol A destes biberões para água destilada e ácido acético 3% a 40°C durante 24 horas (LD_(água destilada)= 2,5 ppb ;LD_(ácido acético)= 3,9 ppb).

5. LEGISLAÇÃO

O bisfenol A faz parte da lista de monómeros autorizados para a produção de plásticos que contactam com alimentos (EC, 2002; EC, 2004).

Para assegurar a protecção dos consumidores a directiva 89/109/EEC (EEC, 1989) diz que os materiais em contacto com alimentos não devem transferir os seus constituintes para os alimentos em quantidades que ponham em perigo a saúde humana ou que causem alterações inaceitáveis na composição dos alimentos. Na directiva 2002/72/EC (EC, 2002) a União Europeia impõe um limite de migração específica para o bisfenol A de 3 mg/kg. Esse valor foi transposto para o direito interno português pelo Decreto-Lei 4/2003 (DL 2003) e corresponde ao limite actualmente em vigor.

No entanto a UE em 2004 reviu este limite de migração específica e reduziu-o para 0,6 mg/kg (EC, 2004) devendo este novo valor entrar em vigor a partir de 31 de Dezembro de 2007.

No caso particular de artigos que se destinam a crianças a migração de bisfenol A não deve exceder os 0,03 mg/Kg (NE 14350 -2, 2004).

A UE definiu também as condições para se realizarem os testes de migração específica. A directiva comunitária 85/572/EEC (EEC, 1985) define os simuladores adequados aos testes de migração de constituintes de materiais e artigos plásticos destinados a contactar com alimentos. A directiva comunitária 82/711/EEC (EEC, 1982) emendada posteriormente pelas directivas

comunitárias 93/8/EEC (EEC, 1993) e 97/48/EC (EC, 1997) definem as regras para a realização dos ensaios de migração em materiais e artigos de plástico que contactam com alimentos.

As condições para a realização dos ensaios de migração no que diz respeito à temperatura, tempo de contacto, simuladores e outros promotores de relevo vêm sistematizados na norma europeia 13130 (*Materials and articles in contact with foodstuffs – Plastics substances subject to limitation - Part 1: Guide to the test methods for the specific migration of substances from plastics into food and food simulants and the determination of substances in plastics and the selection of conditions of exposure to food simulants*) (EN 13130-1, 2002) que recomenda que os ensaios devem ser feitos nas condições mais drásticas dentro daquele que é o uso normal para o artigo em questão.

A UE elaborou ainda uma outra norma onde define os ensaios que devem ser realizados para avaliar a cedência de bisfenol A a partir de artigos destinados a crianças (*Child use and care articles – Drinking equipment - Part 2: chemical requirements and tests*) (EN 14350-2, 2004).

A última avaliação do risco do bisfenol A nos EUA foi feita pela EPA em 1980. Em 1986 o comité científico para os alimentos europeu fez uma avaliação do risco de exposição ao bisfenol A e calculou uma TDI de 50 µg/kg/dia com base num NOAEL de 25 mg/kg/dia. Este valor de NOAEL foi obtido num estudo em ratos, com a duração de 90 dias, em que o bisfenol A foi administrado por via oral; o efeito observado foi a alteração do peso. O valor de NOAEL foi dividido por um factor de 500 devido às incertezas relativamente à base de dados do composto. Posteriormente a UE fez um estudo exaustivo e publicou o Risk Assessment Report Bisphenol A (EURAR, 2003). Nesta avaliação foi calculada uma TDI temporária (t-TDI) de 10 µg/kg/dia com base num NOAEL de 5 mg/kg/dia. O NOAEL neste caso foi obtido num estudo multigeracional em ratos com administração oral de bisfenol A tendo sido observada a redução de peso corporal de adultos e crias, bem como diminuição do peso dos órgãos. No que diz respeito aos efeitos no desenvolvimento e fertilidade o EURAR considerou que os estudos obtidos até então não eram conclusivos, no entanto não podiam ser ignorados pelo que recomendou mais estudos e dada esta

incerteza relativamente aos efeitos do bisfenol A manteve o factor de segurança para o cálculo da t-TDI.

Habitualmente a TDI estabelece-se dividindo o NOAEL por 100 (10×10) sendo um factor (10) referente às diferenças de extrapolação interspécies e o outro (10) referente às diferenças intraespécies.

Para o cálculo da t-TDI do bisfenol A, dadas as incertezas ainda constantes na sua base de dados, foi introduzido um outro factor (5) pelo que neste caso o cálculo da t-TDI foi feito dividindo o valor de NOAEL por 500 ($10 \times 10 \times 5$) (SCF, 2002).

É importante referir que nessa altura existiam apenas 5 dos actuais 115 estudos sobre efeitos de bisfenol A em baixas doses.

Em 2006 o painel científico para os aditivos alimentares, aromatizantes, auxiliares de processamento e materiais em contacto com os alimentos da EFSA publicou uma reavaliação da segurança do bisfenol A. Nesta reavaliação considerou os estudos mais recentes e concluiu que existe actualmente um conjunto de estudos significativo relativo aos efeitos do bisfenol A no desenvolvimento e fertilidade que permite estabelecer um valor de TDI definitivo. Uma vez que o painel considerou não haver razões para manter o factor de dúvida que existia anteriormente relativo ao bisfenol A a TDI foi calculada dividindo o NOAEL por 100. Assim o actual valor da TDI é de 50 $\mu\text{g/kg/dia}$ (que é idêntica a RfD nos EUA). Esta decisão vai naturalmente contra as expectativas de alguns autores que (vom Saal, 2005a) consideram que os actuais limites legais (quer a TDI quer os limites de migração específica) não são suficientemente baixos para proteger a saúde pública e que a exposição humana e de populações selvagens deve ser reduzida sempre que possível.

6. OBJECTIVOS DO ESTUDO

Actualmente o uso de biberões generalizou-se e praticamente todas as crianças contactam com este tipo de recipientes. Dados os condicionalismos da vida actual, que obrigam as mães a preferir alimentos mais fáceis de preparar e transportar, o uso dos tradicionais biberões de vidro tornou-se incómodo sobretudo devido ao seu peso e risco de quebra. Assim a utilização de

biberões de plástico tem vindo a crescer cada vez mais. A grande maioria dos biberões de plástico é actualmente fabricada em PC pelo que, como já foi descrito anteriormente, pode ocorrer migração de bisfenol A para os alimentos que se encontram no seu interior.

Por tudo o que foi exposto até aqui, é importante avaliar o risco de uma população potencialmente exposta ao bisfenol A através dos biberões de PC, que é uma população ainda em desenvolvimento, sobretudo no que diz respeito ao sistema neuroendócrino. A nossa preocupação prende-se com o facto de considerarmos que os alegados efeitos desreguladores endócrinos do bisfenol A nesta população particular, possam ter uma repercussão mais grave e eventualmente irreversível, se comparada com a restante população. Por isso os limites impostos pela União Europeia devem ser neste caso ainda mais restritos e rigorosamente cumpridos.

Foi neste contexto que surgiu este estudo com o objectivo de avaliar o risco associado ao uso de biberões de PC. Assim pretende-se:

1. Caracterizar os hábitos de utilização dos biberões numa amostra da população portuguesa
2. Saber se há migração de bisfenol A a partir dos biberões de PC sujeitos a diferentes condições de pH, temperatura e tempo de contacto.
3. Quantificar a migração de bisfenol A a partir dos biberões de PC.
4. Comparar os níveis de migração de bisfenol A em diferentes marcas de biberões de PC existentes à venda no mercado.
5. Comparar os valores de bisfenol A detectados com os limites admitidos pela legislação.
6. Estimar os níveis de exposição de uma população em risco (crianças alimentadas com biberão de PC) ao bisfenol A.