

Determinação de bisfenol A (BFA) em água mineral por meio de CG/DCE – uma nova proposta de metodologia para análise

Bisphenol A (BPA) determination in mineral water by using CG/DCE – a new analysis methodology proposal

RIALA6/1513

Marcia Helena de Rizzo da MATTA*, Alecsandra Leite PEREIRA, Êmerson MONTAGNER, Guilherme Vilalba FORTUNATO

*Endereço para correspondência: Centro de Ciências Exatas e Tecnologia (CCET), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), CP 549, Campo Grande, MS, Brasil, CEP: 79070-900. E-mail: marciaufms@gmail.com

Recebido: 08.03.2012 – Aceito para publicação: 28.12.2012

RESUMO

Neste trabalho foi avaliada a metodologia para determinar bisfenol A (BFA) em água mineral, utilizando-se a extração em fase sólida (SPE), a derivação com anidrido trifluoroacético (TFAA) e a análise por cromatografia em fase gasosa com detector de captura de elétrons (GC/ECD). A curva analítica forneceu coeficiente de correlação (R) de 0,999, valores de recuperação entre 88 e 106%, limites de detecção e de quantificação de 2,5 e 25,0 ng.mL⁻¹, respectivamente. A metodologia foi aplicada em quatro amostras de diferentes marcas de água mineral, dentre as quais apenas uma apresentou resultado detectável de 0,46 ng.mL⁻¹. Este estudo sugere que o BFA pode ser facilmente detectado e quantificado na matriz utilizada por meio de metodologia proposta, a qual demonstrou ser seletiva, precisa e exata.

Palavras-chave. bisfenol A, água mineral, GC/ECD.

ABSTRACT

This study evaluated the methodology for determining bisphenol A (BPA) in mineral water by using the solid phase extraction (SPE), the derivatization with trifluoroacetic anhydride (TFAA), and the gas chromatography with electron capture detector (GC/ECD) analysis. The analytical curve provided the correlation coefficient (R) of 0.999, and the recovery values from 88 to 106%. The limit of detection was 2.5 and the limit of quantification was 25.0 ng.mL⁻¹. Four mineral water samples from different brands were analyzed by this methodology and among them only one (sample 3) showed detectable result of 0.46 ng.mL⁻¹. This study suggested that BPA could be easily detected and quantified in mineral water samples by employing the proposed methodology, which was selective, accurate and precise.

Keywords. bisphenol A, mineral water, GC/ECD

INTRODUÇÃO

Atualmente, as maiores preocupações em relação à exposição de humanos e outros animais aos agentes e substâncias químicas, que promovem alterações no sistema endócrino e nos hormônios, denominados desreguladores endócrinos (DE), são: se essas substâncias podem produzir efeitos tóxicos em baixas concentrações; quais substâncias estão associadas aos efeitos tóxicos a baixas concentrações; se essas substâncias estão presentes em concentrações ambientalmente relevantes que possam ser uma ameaça à saúde de humanos e animais; se existe uma concentração limiar abaixo da qual essas substâncias químicas podem ser consideradas como seguras¹.

Hipóteses prevendo alterações no funcionamento do sistema endócrino de algumas espécies animais expostas a determinadas substâncias químicas tóxicas não são novas, pois em 1938 foi feita a primeira demonstração de que alguns produtos químicos poderiam ter ação estrogênica quando administrados em animais. Recentemente, essa questão voltou à tona com atenção por parte da comunidade científica, principalmente devido ao surgimento de novas hipóteses, extremamente sérias e mais específicas, que levantam a possibilidade da exposição a agentes químicos ambientais com ação estrogênica – que promovem alterações no sistema endócrino humano e nos hormônios – poder estar relacionada ao aumento da incidência de câncer de mama, queda da quantidade de esperma, diminuição da fertilidade, defeitos congênitos secundários à exposição fetal e outras alterações².

Dentre as várias substâncias capazes de afetar o sistema endócrino, destaca-se o bisfenol A (BFA)¹.

O BFA, 2,2-bis(4-hidroxifenil)propano, é uma substância química produzida em grandes quantidades para uso principalmente na produção de plásticos policarbonato e resinas epóxi. A produção mundial foi estimada em 2,5 milhões de toneladas em 2001^{1,3-5}. O policarbonato, composto de monômeros de BFA, possui várias qualidades comerciais desejáveis, como transparência, moldabilidade e alta força de impacto⁶.

A exposição humana ao BFA não é insignificante, considerando que policarbonatos e resinas epóxi, tendo como base o BFA, apresentam várias aplicações, como, por exemplo, garrafas de bebidas, potes de comida para bebês, revestimento anticorrosivo em latas de alimento, fabricação de discos compactos, selantes dentários, equipamentos de segurança e dispositivos médicos^{6,7}.

Desde o reconhecimento de que o BFA possui propriedades estrogênicas fracas, muitos estudos foram feitos para estimar a exposição humana e as concentrações ambientais do composto. O BFA migra em níveis de $\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ dos produtos do policarbonato⁸ ou de revestimento epóxi em latas⁹ à água durante processos térmicos. O BFA migra também das mangueiras de PVC (cloreto de polivinila) à água em temperatura ambiente e pH neutro¹⁰. Tal composto tem sido recentemente relatado como o mais potente mimetizador antropogênico¹¹. Análises do BFA demonstraram que este composto induz proliferação, alteração na região reprodutiva da fêmea, bem como câncer no testículo e na próstata, redução de esperma, desmasculinização, feminilização, alteração nas funções de imunidade e diminuição de fertilidade em pássaros, peixes e mamíferos¹².

Nos últimos anos, o consumo de água engarrafada tem crescido de maneira bastante acentuada no mundo todo, sendo a maioria das garrafas feita de polietileno tereftalato (PET) – um plástico derivado do petróleo –, das quais podem migrar determinadas substâncias, como o BFA¹³. Estudos de laboratório demonstram que o BFA biologicamente ativo é liberado a partir de garrafas de policarbonato, seguindo a simulação de uso normal. Por isso, acredita-se que uma importante fonte de BFA esteja na ingestão de alimentos e bebidas que tenham estado em contato com resinas epóxis ou plásticos policarbonato¹⁴⁻¹⁷. A proposta deste trabalho foi, portanto, desenvolver e validar uma metodologia de análise simples, rápida, eficiente e não onerosa para determinação de BFA em água mineral – armazenada em diferentes embalagens, utilizando-se extração em fase sólida (EFS) e análise por cromatografia em fase gasosa com detector de captura de elétrons (CG-DCE) –, bem como contribuir ineditamente para o início do monitoramento do contaminante em questão nas águas minerais comercializadas no nosso país.

MATERIAL E MÉTODOS

Padrões, soluções e materiais

A solução estoque de BFA (Aldrich, EUA, 95%) na concentração de $102 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e soluções de trabalho de BFA na concentração de $1,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ foram preparadas em etanol (Vetec, Brasil, 95%).

A solução de água/metanol na proporção 9/1 (v/v) foi feita com água ultrapurificada (Elga, condutividade

18,2 mΩ.cm⁻¹) e metanol (Dinâmica, Brasil, grau HPLC/UV), este último também utilizado no decorrer do processo analítico, no qual também foram utilizados acetato de etila (Mallinckrodt, México, grau HPLC), hexano (Vetec, Brasil, 95%, grau análise de pesticidas) e anidrido trifluoracético TFAA (Aldrich, EUA, ≥ 99%).

Para a EFS foram utilizados cartuchos STRATA-X de 200 mg x 3 mL (Phenomenex, EUA) em um sistema de extração de 12 posições da Supelco (EUA) acoplado à bomba de vácuo da Tecnal (Brasil), com pressão de 20 mmHg.

Para procedimentos de secagem no tratamento analítico foi utilizado nitrogênio (5.0, White Martins, Brasil, grau analítico).

Amostra testemunha

Para os ensaios de testemunha foi utilizada, como amostra, água isenta de BFA e de todos os demais reagentes descritos, aplicados ao método proposto, a título de isentar a matriz de possíveis interferências na determinação do analito.

Branco

Os ensaios de branco consistiram em realizar todo o procedimento de extração sem a passagem de amostra pelo sistema de extração, a fim de verificar a isenção de possíveis interferências na análise do BFA.

Amostras

Foram usadas quatro amostras de água mineral, descritas na Tabela 1, tendo-se como critério de seleção os diferentes materiais utilizados nas embalagens: PET, PVC, PP (polipropileno) e vidro, atendendo a uma necessidade de aplicação da metodologia desenvolvida, visando possibilitar o estudo da verificação da presença de BFA nas amostras.

Tabela 1. Descrição das amostras reais de água mineral

Amostra	Tipo	Embalagem	Volume
1	Água mineral natural	PET	1,50 L
2	Água mineral natural	PVC	1,50 L
3	Água mineral natural	PP	310 mL
4	Água mineral natural com gás*	Vidro	330 mL

*Submetida a 60 minutos em ultrassom (Spencer, Unique, Brasil) para desgaseificação.

Não foi necessário executar procedimentos específicos para conservação das amostras, visto que foram adquiridas várias unidades, de mesmo lote e de

cada tipo de embalagem, no comércio local (Campo Grande/MS), abrigadas sob ausência de luz, em local fresco, à temperatura ambiente até serem submetidas ao procedimento analítico, dentro do prazo de validade especificado nas embalagens.

Preparo das amostras

Extração

A extração do analito foi efetuada por EFS, utilizando-se 500 mL de amostra para cada ensaio. Os cartuchos foram condicionados com a passagem sequencial, sob vácuo, com vazão de 1,5 mL.min⁻¹ de 5,0 mL de acetato de etila e 5,0 mL de metanol, repouso de 5 min, e 15,0 mL de água ultrapura, recebendo em seguida a amostra com vazão aproximada de 4 mL.min⁻¹, sendo, no término deste processo, o cartucho utilizado lavado com 1,0 mL de solução água/metanol (9:1) (v/v) e seco sob vácuo durante 80 min. A eluição foi efetuada com 4,0 mL de metanol com vazão de 1 mL.min⁻¹, e o eluato levado à secura sob fluxo brando de nitrogênio, sendo o extrato obtido redissolvido em 2,0 mL de metanol, em frasco apropriado com tampa para posterior realização da reação de derivação.

Derivação

Visando o aumento de sensibilidade, de modo a proporcionar melhor interação do analito frente à coluna utilizada, conforme proposto por Costa¹⁸, os extratos obtidos foram secos novamente sob suave corrente de N₂, e a derivação foi efetuada adicionando-se 200 µL de TFAA a cada frasco, fechando-os e agitando-os por 30 s. Após a homogeneização, foram mantidos em repouso por 15 min em estufa a 40 °C, sendo posteriormente secos sob fluxo de N₂, retomados ao volume de 1,0 mL com hexano, lacrados e reservados sob refrigeração para análise imediata. A Figura 1, a seguir, ilustra a reação de derivação do BFA com TFAA.

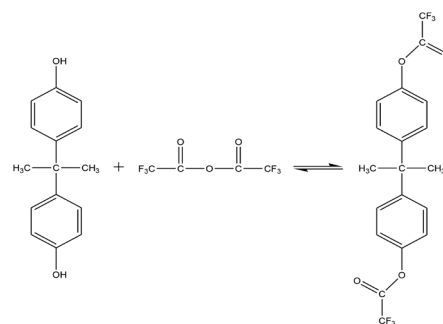


Figura 1. Reação de derivação do BFA com TFAA

Análises

As análises foram efetuadas em cromatógrafo a gás acoplado ao detector por captura de elétrons CP-3800 (Varian), equipado com uma coluna capilar WCOT de sílica fundida, CP-Sil 13CB (50 m x 0,32 mm x 0,4 µm) da Varian. Utilizou-se hélio (5.0 analítico, White Martins) como gás de arraste e nitrogênio (4.6, White Martins) como gás de *make-up*. O volume de injeção foi de 1,0 µL no modo sem divisão (*splitless*). Para geração e tratamento dos dados cromatográficos foi utilizado o software SATURN 2100. As condições cromatográficas estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Condições cromatográficas do método analítico

Temperatura do injetor (°C)	270
Temperatura do detector (°C)	280
Programação de temperatura da coluna	Inicial: 120 (2 min)
	120-210 (15 °C.min ⁻¹)
	210-280 (10 °C.min ⁻¹) Final: 280 (5 min)
Pressão na coluna (psi)	12,3
Vazão do gás de arraste (mL.min ⁻¹)	2,1
Vazão do gás de <i>make-up</i> (mL.min ⁻¹)	30
Tempo de análise (min)	20

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Validação do método

Seletividade

Os cromatogramas obtidos das amostras do branco, da testemunha e do padrão BFA evidenciaram que no tempo de retenção do BFA (12,9 min) não foram registrados picos cromatográficos, indicando que não houve interferências da matriz no padrão, garantindo, portanto, que o método é especialmente seletivo.

Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Os LD e LQ foram determinados pela relação sinal: ruído da linha base, empregando-se soluções diluídas até se obter um sinal referente ao analito com uma altura média igual a três vezes o sinal referente ao ruído para o LD e dez vezes para o LQ¹⁹. Determinou-se, portanto, para o equipamento os valores de 7,5 e 25,0 ng.mL⁻¹ (LD e LQ, respectivamente) e para o método os valores de 1,5 x 10⁻² e 5,0 x 10⁻² ng.mL⁻¹ (LD e LQ, respectivamente).

Linearidade, faixa de trabalho e sensibilidade

O tempo de retenção do BFA derivado com TFAA obtido foi de 12,9 min.

Foram feitas análises em triplicata das soluções padrão de BFA derivado com TFAA para a elaboração da curva analítica. A equação da curva analítica obtida, linear numa faixa de 25 a 250 ng.mL⁻¹, foi: $y = 60,284 + 1,216x$, com $R = 0,9928$. Os valores obtidos de inclinação e do fator de correlação evidenciam que existe uma correlação fortíssima entre as concentrações estudadas e os sinais gerados pelo equipamento, indicando a possibilidade de distinção entre duas concentrações próximas, revelando que o método mostrou-se sensível²⁰.

Ensaio de recuperação

Os ensaios de recuperação, parâmetros necessários para avaliar a precisão e exatidão do método²⁰, efetuados por meio das análises cromatográficas, apresentaram excelentes resultados.

As amostras fortificadas e derivadas com TFAA foram submetidas ao procedimento analítico (em triplicata), sendo os dados concernentes às análises apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Dados obtidos nos ensaios de recuperação de BFA

Níveis de LQ	Concentração (ng mL ⁻¹) ^a	CV (%) ^c	Recuperação (%) ^b
1LQ	25	15,5	88
3LQ	75	10,9	79
5LQ	125	13,2	106

^aConcentração de padrão de BFA na matriz; ^bCoefficiente de variação; ^cRecuperação média

Exatidão e precisão

A porcentagem de recuperação determina a exatidão do método. Na Tabela 3 observa-se que a recuperação das amostras (79-106%) está dentro do limite (70-120%) estabelecido pela literatura de análise de resíduos¹⁹⁻²¹.

Avaliou-se a precisão do método pelos valores dos coeficientes de variação percentual [CV (%)], que sofreram variação de 10,9 a 15,5%, com média de 13,2%, sendo, portanto, o método considerado preciso, dado que os valores determinados ficaram abaixo do recomendado pela literatura, que é de 20%^{19,20}.

Aplicação do método em amostras comerciais de água mineral

Os resultados obtidos com a aplicação do método proposto (em triplicata) em quatro tipos de amostras de água mineral são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Resultados da análise de BFA em água mineral

Amostra	Concentração (ng.mL ⁻¹)
1	≤ LD
2	≤ LD
3	0,46
4	≤ LD

LD: limite de detecção; n = 3

Uma vez que o limite máximo de migração do BFA, das embalagens para os alimentos e bebidas, permitido no Brasil, referenciado no estabelecido pela Comunidade Europeia em 2004, é de 0,6 µg.g⁻¹ de material plástico^{22,23}, a quantidade de BFA encontrada nas amostras está dentro do permitido.

Mesmo sendo prejudicial à saúde humana e ao meio ambiente, não existem limites estabelecidos para o BFA em lançamento de efluentes, visto que nada consta na Resolução nº 430 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) sobre o BFA²⁴. Mundialmente, também não há uma quantidade consensual de ingestão diária para o ser humano.

Apesar dos muitos pontos conflitantes, há um consenso comum entre muitos pesquisadores relacionado às evidências das atividades deletérias de algumas substâncias exógenas, dentre elas o BFA, para o sistema endócrino, denotando a importância das metodologias de detecção e quantificação desses compostos a fim de que seja possível elaborar um sistema de vigilância e prevenção, tanto para o meio ambiente quanto para a saúde humana.

Consideramos de imensa importância que os órgãos nacionais ligados à saúde e ao meio ambiente passem a considerar os contaminantes endócrinos, entre eles o BFA, passíveis de controle, estabelecendo limites para esses compostos em produtos de utilização e consumo humano, como, por exemplo, bebidas e alimentos, uma vez que são considerados extremamente danosos e sérios ameaçadores da reprodução das espécies, principalmente da própria reprodução e sobrevivência humana.

CONCLUSÃO

Uma metodologia utilizando a CG/DCE para análise de BFA em água mineral foi desenvolvida e validada, vindo a somar às metodologias existentes, ampliando o leque de instrumentação utilizado para verificação e monitoramento desse contaminante.

A EFS mostrou-se adequada, fácil de realizar e relativamente rápida.

O método proposto forneceu parâmetros analíticos apropriados (LD, LQ e linearidade da curva analítica), sendo considerado seletivo, preciso e exato, conforme os valores obtidos das recuperações e de CV (%).

Quando aplicado a amostras reais, o fato de apenas uma delas, aliás, a menos provável pelo tipo de material, ter apresentado valor detectável de BFA evidencia a necessidade de monitorar e acompanhar os níveis desse contaminante nos vários tipos de recipientes e embalagens de alimentos, bebidas e medicamentos, entre outros, utilizados comercialmente, de modo a fornecer suporte para uma modelagem matemática do consumo humano desse composto, avaliando os possíveis riscos à saúde e a prevenção dos mesmos.

Os resultados obtidos visam demonstrar a aplicabilidade da metodologia proposta em análises de monitoramento de BFA em água mineral, com alto grau de confiabilidade, não expressando formas ou rotas de contaminação.

AGRADECIMENTOS

À Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPP)/UFMS, pelo apoio financeiro, e ao Ministério da Educação (MEC), pela bolsa concedida e pelo auxílio financeiro, relativos ao Programa de Educação Tutorial (PET).

REFERÊNCIAS

1. Biles JE, Mcneal TP, Begley TH, Hollifield HC. Determination of bisphenol A in reusable polycarbonate food-contact plastics and migration to food-simulating liquids. *J Agric Food Chem*. 1997;45:3541-4.
2. Goloubkova T, Spritzer PM. Xenoestrogênios: o exemplo do bisfenol-A. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2000;44:323-30.
3. Fürhacker M, Scharf S, Weber H. Bisphenol A: emissions from point sources. *Chemosphere*. 2000;41:751-6.
4. Staples CA, Dorn PB, Klecka GM, O'Block ST, Haris LR. A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere*. 1998;36:2149-73.
5. Leandro FZ, Marchi MR. Bisphenol A: emissions from point sources. *Chemosphere*. 2000;41(5):751-6.
6. Nira BJ, Steinmetz R. Xenoestrogens: the emerging story of bisphenol A. *Trends Endocrinol Metabol*. 1998;9:124-8.
7. Bisphenol A. *The New York Times*. [acesso em 2012 jul 18]. Disponível em: [http://topics.nytimes.com/top/reference/timestopics/subjects/b/bisphenol_a/index.html].
8. Krishnan AV, Starhis PS, Permuth F, Tokes L, Feldman D. Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology*. 1993;132:2279-86.

9. Brotons JA, Olea-Serrano MF, Villalobos M, Pedraza V, Olea N. Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environ Health Perspect*. 1995;103:608-12.
10. Yamamoto T, Yasuhara A. Determination of bisphenol A migrated from polyvinyl chloride hoses by GC/MS. *Bunseki Kagaku*. 2000;49:443-7.
11. Kuo HW, Ding WH. Trace determination of bisphenol A and phytoestrogens in infant formula powders by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2004;1027:67-74.
12. Zafra A, Olmo M, Suárez B, Hontoria E, Navalón A, Vilchez JL. Gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of bisphenol A and its chlorinated derivatives in urban wastewater. *Water Res*. 2003;37:735-42.
13. Muerza AF. Impacto ambiental del agua embotellada. [acesso em 2012 jul 18]. Disponível em: [http://www.consumer.es/web/es/medio_ambiente/urbano/2007/05/13/162594.php].
14. Brede C, Fjeldal P, Herikstad H. Increased migration levels of bisphenol A from polycarbonate baby bottles after dishwashing, boiling and brushing. *Food Addit Contam*. 2003;20:684-89.
15. Kang JH, Kondo F, Katayama Y. Human exposure to bisphenol A. *Toxicology*. 2006;226:79-89.
16. Le HH, Carlson EM, Chua JP, Belcher SM. Bisphenol A is released from polycarbonate drinking bottles and mimics the neurotoxic actions of estrogen in developing cerebellar neurons. *Toxicol Lett*. 2008;176:149-56.
17. Fox JE, Gullede J, Englhaupt E, Burow ME, McLachlan JA. Pesticides reduce symbiotic efficiency of nitrogen-fixing rhizobia and host plants. *PNAS*. 2007;104:10282-7.
18. Costa LA. Desenvolvimento e validação de metodologia de análise de bisfenol A em amostras de águas naturais por CG-EM [dissertação de mestrado]. Campo Grande (MS): Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2008.
19. Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSE, Melo LFC. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim Nova*. 2004;27:771-80.
20. Brito NM, Amarante Junior OP, Polese L, Ribeiro ML. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. *Pesticidas: R Ecotox Meio Ambiente*. 2003;13:129-46.
21. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Aprova o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. *Diário Oficial da União, Brasília (DF)*; 2 jun 2003; Seção 1.
22. Sociedade Brasileira de Química (SBQ) – Regional Rio de Janeiro. Canadá proíbe o uso de policarbonato na confecção de mamadeiras a partir de 2009. [acesso em 18 jul 2012]. Disponível em: [<http://www.uff.br/sbqrio/novidades/bisfenol%20policarbonato%20mamadeira.html>].
23. Official Journal of the European Union. Commission Directive 2004/19/EC of 1 March 2004 amending Directive 2002/72/EC relating to plastic materials and articles intended to come into contact with foodstuffs. [acesso em 2012 jul 18]. Disponível em: <http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/commdir200419ec.pdf>
24. Brasil. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. *Diário Oficial da União, Brasília (DF)*; 16 maio 2011; Seção 1:89.