

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE BISFENOL-A EM AMOSTRAS AQUOSAS

Lúcia GUÊZO (1); Jéssica CASTRO (2); Pablo CRUZ (3); Natilene BRITO (4); Ozelito POSSIDONIO(5)

Centro Federal de Educação Tecnologia do Maranhão, Avenida Getúlio Vargas n. 04, Monte Castelo, (98) 32189000.

e-mail: lguenzo7@hotmail.com

(2) CEFET-MA, e-mail: dr_jessica10@hotmail.com

(3) CEFET-MA, e-mail: olbapcs1@hotmail.com

(4) CEFET-MA, e-mail: natilene@cefet-ma.br

(5) CEFET-MA, e-mail: ozelito@cefet-ma.br

RESUMO

O presente trabalho visou à determinação de um composto com conhecido efeito hormonal. Foi tomada como área de estudo, a bacia hidrográfica do rio Anil, na Ilha do Maranhão. A ocupação do solo nesta bacia, por uma malha urbana densa, com atividades econômicas, instalação de residências nas margens do rio e o despejo de resíduos sólidos e efluentes domésticos diretamente no seu leito, foi avaliada, levando-nos a supor seu estado de contaminação. Foram analisadas as águas superficiais com relação a parâmetros físicos e químicos, além da determinação de bisfenol-A, amplamente utilizado como plastificante na produção de policarbonatos (materiais empregados no envasamento de água e outros líquidos), resinas, materiais dentários, revestimentos de latas de conservas, entre outros. Desenvolveu-se um método cromatográfico simples e rápido com detecção por UV que foi empregado na análise das referidas amostras. No intuito de avaliar a exposição da população frente a este composto, foram analisadas, ainda, amostras de água mineral comercializada na Ilha do Maranhão.

Palavras chave: Poluentes Orgânicos; Contaminação; Efeito endócrino.

1-INTRODUÇÃO

A preocupação com diferentes poluentes no ambiente, que podem causar diferentes danos aos organismos, desde efeitos carcinogênicos até teratogênicos (efeitos no nascimento) tem crescido desde a Segunda Guerra Mundial, com o advento dos pesticidas sintéticos. Entretanto, na última década um novo grupo de compostos tem atraído a atenção de diversos pesquisadores pelo mundo: os perturbadores endócrinos (ou agentes hormonalmente ativos – AHAs). Tais compostos podem perturbar o sistema endócrino de diversos animais, incluindo-se os humanos, uma vez que mimetizam a dinâmica dos hormônios, substituindo-os, ou, ainda, inibi-los ou alterar as funções normais do sistema imunológico ou nervoso (Castro, 2002). Nos níveis em que se encontram no ambiente, tais substâncias não levam à morte das células nem atacam o DNA. Sua ação é sobre os hormônios, podendo, ainda, aumentar ou diminuir as concentrações dos hormônios naturais (Santa Marta, 2001). Isto pode levar a um quadro em que a informação contida no DNA defina uma determinada característica, mas no momento em que a mensagem química é enviada para as células, os distúrbios causados por estes poluentes podem levar a resultados diferentes do esperado. Assim, os indivíduos não serão construídos de forma correta, embora os seus gens possuam as informações necessárias para isto (Dumanoski *apud* Mozeto, *on line*, 2005).

Estudos relacionam o aumento do número de abortos e do número de casos de câncer de testículos e a diminuição da contagem de espermatozoides em humanos com atividades profissionais que exigem a manipulação de bisfenol-A e seus derivados em materiais dentários, citando ainda como a feminilização e a diminuição do tamanho testicular (Coelho, 2002). A figura 1 apresenta a fórmula estrutural do composto em estudo.

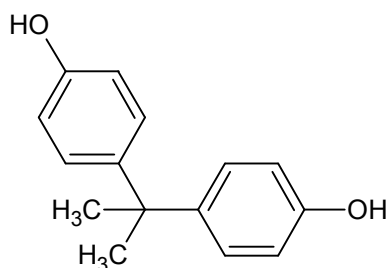


Figura 1. Fórmula estrutural do Bisfenol-A

Estas substâncias podem ser naturais, como os fitoestrogênios presentes em alguns alimentos, como os produtos a base de soja, ou compostos sintéticos, como alguns inseticidas (os organoclorados), os PCBs, os alqui-fenóis polietoxilados (AFPE), as dioxinas, o dibenzeno-furano, os ftalatos e o bisfenol-A (Castro, 2002). Dentre as diferentes substâncias tóxicas presentes nas águas que podem causar efeitos sobre o sistema endócrino, destaca-se o bisfenol-A, plastificante, empregado na obtenção de policarbonatos, utilizado nos frascos de água potável, de resinas usadas na embalagem de alimentos e em fornos microondas, em gavetas de refrigeradores, em mamadeiras, em selantes dentários, entre outros produtos (Nascimento Filho et al., 2001; Castro, 2002; Coelho, 2002).

O bisfenol-A (2,2-bis-4-hidroxifenil propano, $C_{15}H_{16}O_2$) é encontrado como flocos sólidos ou pó, com coloração variando de branco a marrom claro, de odor fraco que lembra remédio, sendo mais denso que a água, densidade relativa 1,195 a 25° C, massa molar de 228,28 g.mol, ponto de ebulição de 157°C, solubilidade na água de 0,6 g.L⁻¹ a 25°C. Os dados toxicológicos deste composto são: LD₅₀ para ratos de 3,300mg.kg⁻¹ via oral; LD₅₀ para camundongos de 2,500 mg.kg⁻¹ via oral e de 150 mg.kg⁻¹ via dérmica (intra-peritoneal); LD₅₀ para coelhos de 2,230 mg.kg⁻¹ via oral; LD₅₀ para mamíferos de 6,500 mg.kg via oral. Este composto é irritante para o nariz, garganta, olhos e pele (Cetesb, *on line*, 2005).

A primeira pessoa a trabalhar com Bisfenol-A foi Krishman em 1993. Ele usou o método de extração por autoclavagem com frascos de policarbonato. O interesse ambiental e de saúde pública com relação à presença de bisfenol-A em amostras de água e alimentos baseia-se no fato de que este composto pode apresentar efeitos endócrinos em concentrações menores que 1ng.L⁻¹ (Watabe *et al.*, 2004), ou seja, em níveis de parte por trilhão (ppt). Cabe ressaltar o fato de não haver legislação brasileira que estipule valores permitidos neste composto em diferentes índices. Tais estudos podem servir de referência para que se façam análises do ciclo de vida dos produtos que o contém a fim de diminuir sua utilização, substituindo-o por materiais mais seguros.

2-REVISÃO DA LITERATURA

Para a devida determinação de Bisfenol-A em amostras ambientais, métodos suficientemente sensíveis devem ser desenvolvidos. Dentre os métodos encontrados na literatura, podem-se destacar aqueles baseados em cromatografia gasosa (CG) acoplada à espectrometria de massa (EM), por conciliar a alta resolução da CG à elevada especificidade da EM. Nascimento Filho e colaboradores (2002) desenvolveram método empregando extração em fase sólida (EFS) empregando resina polimérica XAD-4, para a determinação deste e de outros poluentes em chorume. Esta também utilizando EFS com cartuchos de copolímero N-vinilpirrolidona/difenilbenzeno, para a determinação deste composto em amostras de água de rios e costeiras, encontrando recuperações de 73% e limite de detecção de $0,002 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Azevedo e colaboradores, 2001). Entretanto, esta técnica apresenta a desvantagem de exigir processos de pré-tratamento laboriosos, além de elevado custo operacional (Watabe e colaboradores, 2004).

Watabe e colaboradores (2004), desenvolveram material de reconhecimento molecular, baseado em impressão molecular, para a etapa de pré-concentração, e posterior determinação em CLAE com detector eletroquímico e de UV. Estes autores empregaram coluna C18 e fase móvel com tampão fosfato de sódio (pH 7,0)/ acetonitrila (65:35, v/v). Observaram, ainda, que o sinal obtido pelo detector eletroquímico se mostrou muito maior que aquele observado para UV, obtendo-se melhores limites de detecção.

Junko Sajiki e colaboradores (1999), desenvolveram um projeto para análise de soros em relação a presença de Bisfenol-A, utilizando dois sistemas de alta performance em cromatografia líquida. Os métodos utilizados foram: EFI-MS (ionização por impacto de elétrons e ED (detector eletroquímico). No sistema de CLAE e detector eletroquímico foram utilizados os seguintes solventes: acetonitrila- água- ácido fosfórico (40:60:0,2). Utilizou-se como um padrão soro de feto bovino comercial.

Braunrath e colaboradores (2005), Yen Sun e colaboradores.(2000) analisou latas de refrigerantes, frutas e vegetais. Utilizou o método de CLAE com quimiluminescência por reação com peroxialato. Foi empregada a mistura de acetonitrila- imidazol- HNO_3 como fase móvel.

Costner Pat e Jonh Butcher (greenpeace internacional, *on line*) fizeram um trabalho de análise de poeiras de casas e locais de trabalho. Nesse trabalho fez-se a análise de várias substâncias, dentre elas, o Bisfenol-A. No pré-tratamento as amostras foram armazenadas em temperatura ambiente até a análise. A extração foi feita pelo seguinte método: a amostra foi precipitada por Soxhlet, de um dia para o outro, com diclorometano. O extrato foi filtrado e reduzido a um volume final de 25 mL com diclorometano. Uma parte desse extrato foi evaporada até se tornar seca, sob nitrogênio. O resíduo foi dissolvido novamente em uma mistura 50/50 de água e metanol. Por final, o extrato foi filtrado através de um filtro de $0,45 \mu\text{m}$ e preparado para as análises instrumentais. O Bisfenol-A foi analisado com o uso da cromatografia líquida em combinação com espectrometria de massa (CL/MC). A CL/MS foi feita em um sistema HEWLETT PACKARD 1100(LC/ESI/MS) equipado com uma pré-coluna e uma coluna analítica C18 de comprimento 15 cm, id.de $13,9 \text{ mm}$.

Azevedo, e colaboradores (2001) utilizaram um método analítico que envolveu a preconcentração de 200mL de água, utilizando extração por fase sólida com cartuchos OÁSIS, seguida de análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Neste projeto analisou-se tanto a presença do Bisfenol-A como do 4-nonifenol. As recuperações do Bisfenol-A e do 4-nonifenol foram 119% e 73% respectivamente, os limites de detecção foram de $0,002 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente. Foram analisadas 135 amostras. As concentrações dos compostos estudados variam de 0,2 e $4,0 \mu\text{g L}^{-1}$ e 0,2 a $30 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Somente em duas amostras de água de rio, a concentração dos isômeros de 4-nonifenil ultrapassou $10 \mu\text{g L}^{-1}$ e do Bisfenol-A $2 \mu\text{g L}^{-1}$.

Jin, e colaboradores (2004) determinaram o 4-terc-octilfenol (OP), o 4-nonilfenol (NP) e Bisfenol-A (BPA) na superfície das águas do Rio Haihe em Tianjin na China, por cromatografia gasosa e espectrometria de massa. Foi feita extração e concentração a partir de 300mL de amostras de água por extração líquido-líquido usando diclorometano anidrido e trifluorometano. Quatorze amostras, foram analisadas, dentre elas, somente uma tinha uma concentração relativamente alta de Bisfenol-A ($8,30 \mu\text{g L}^{-1}$) e NP ($0,55 \mu\text{g L}^{-1}$). As concentrações de OP, NP e Bisfenol-A em outras amostras foram de 18,0-20,2, 106-296 e 19,1-106 ng L^{-1} V, respectivamente. Recuperação para OP, NP e BPA nas amostras de água foram todos superiores a 80%

Métodos empregando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) também podem ser empregadas com detecção por UV, fluorescência ou eletroquímico. Considerando o fato de que métodos baseados em CLAE, geralmente, apresentam limites de detecção superiores áqueles observados na CG, fazem-se necessários passos de pré-concentração que forneçam melhores resultados. Braunrath & Cichina (2005) desenvolveram método baseado na extração em fase sólida por imuno-afinidade, empregando coluna C18, com fase móvel de tampão acetato de sódio (pH 4,8)/ acetonitrila (60:40 v/v) e limite de detecção de $0,1 \text{ ng.mL}^{-1}$, para amostras de alimentos sólidos.

3-PARTE EXPERIMENTAL

Utilizaram-se os solventes Metanol, Diclorometano, Acetonitrila e N-hexano, todos grau cromatográfico, obtidos pela Merck. O padrão da substância Bisfenol-A foi gentilmente cedidos pela indústria Petrom Petroquímica de Mogi das Cruzes.

A solução estoque (padrão) foi preparada da seguinte maneira; pesou-se 0,0100 g de Bisfenol-A, diluindo-se em 100 mL de Metanol, para obtenção da solução estoque na concentração de 100 mg L^{-1} do composto estudado.

Os parâmetros físicos e químicos da água do rio Anil foram determinados pelo kit de qualidade de água desenvolvido pelo Grupo de Estudos Ambientais (CEFET-MA).

Foi utilizado o Cromatógrafo Líquido Shimadzu, modelo LC20AT, injetor Rheodine® de 20 μL , detector SPD20A, coluna C18 de 15 cm, uma pré-coluna C18 de 5 cm. Um rotavapor Buchi, modelo R-114. Cedido pelo Laboratório de Produtos Naturais da UFMA.

Toda parte instrumental utilizada no laboratório foi constituída de vidrarias ou de materiais metálicos evitando quaisquer contatos com objetos poliméricos. Em vista disso, montou-se um sistema para destilação de água, no qual todos os componentes são de vidro a fim de evitar tal contaminação.

3.1-Procedimentos experimentais

Após a preparação da solução estoque (100ppm), realizou-se os testes para definição da melhor composição para a fase móvel e comprimento de onda de acompanhamento. Após a definição destes parâmetros, construiu-se a curva analítica pela injeção de 20 μL de soluções padrão com concentrações entre 0,01 e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$. Foram investigadas as eficiências de procedimentos de extração líquido-líquido e extração em fase sólida (EFS), através de estudos de recuperação, fortificando-se amostras de água destilada em sistema de vidro no nível de $0,004 \text{ mg L}^{-1}$. Amostras de água mineral e águas superficiais do rio Anil foram analisadas pelo procedimento desenvolvido.

3.1.1-Extração líquido-líquido

Após a fortificação de 50 mL de amostra de água destilada em sistema de vidro, realizou-se extração com 50 mL do sistema de solventes N-hexano:diclorometano (50:50, v/v), adicionando-se cloreto de sódio para modificar a força iônica do meio, em três etapas. Os extratos foram combinados e evaporados em evaporador rotatório até 2 mL, secando-se sob suave corrente de N_2 . Os resíduos foram retomados com 1 mL de metanol e analisados por cromatografia líquida. Analisaram-se estas amostras fortificadas em triplicata.

3.1.2-Extração em fase sólida

Os cartuchos de C18 foram condicionados com 2 mL de metanol seguidos de 2 mL de água destilada. Após a fortificação de 250 mL de amostra de água destilada, realizou-se extração com fluxo de 1 mL min^{-1} . Bisfenol-A foi eluído com 1 mL de metanol. Os extratos foram analisados por cromatografia líquida. Estas análises foram realizadas em triplicata.

4-RESULTADOS E DISCURSÕES

A localização do rio Anil é apresentada na Figura 2. As fotografias dos pontos de coleta, na campanha do período de seca e de chuva, são apresentadas nas Figuras 3, 4 e 5. Foram definidos três pontos de coleta, um na região de nascente (Figura 3), outro em ponto intermediário do comprimento do rio (Figura 4) e o terceiro na sua foz (Figura 5).

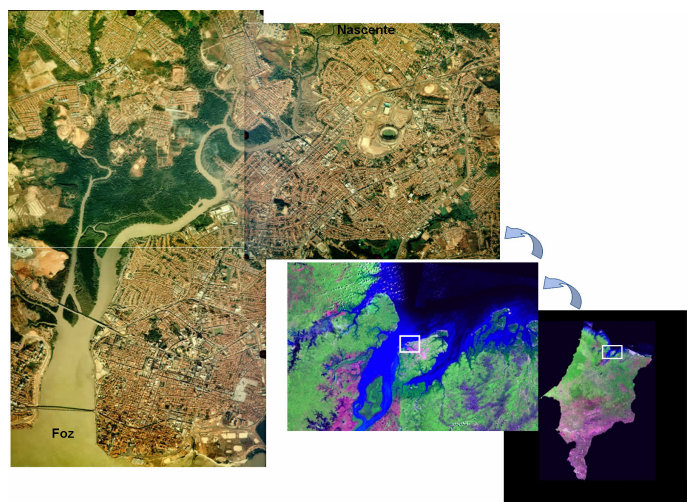


Figura 2. Localização do rio Anil (Adaptada do sítio do Governo do Estado do Maranhão).

Foram realizadas análises dos parâmetros físicos e químicos, com kit de qualidade de água, desenvolvido no Grupo de Estudos Ambientais, no local de análise, com resultados apresentados na Tabela 1.

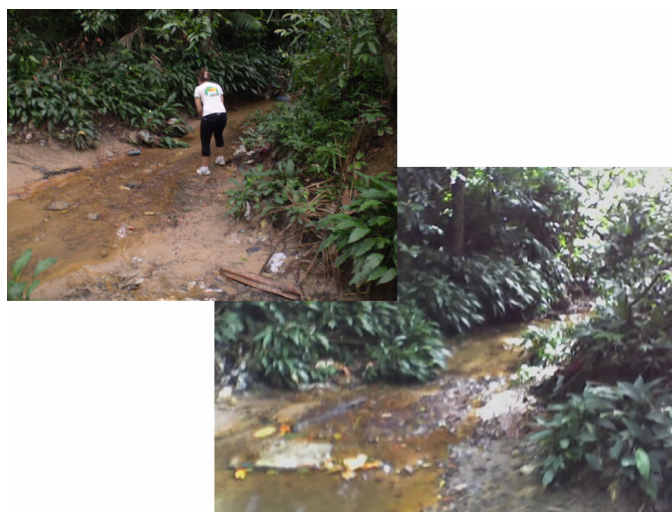


Figura 3. Ponto de coleta 1, região de nascente, nos períodos de cheia e estiagem.



Figura 4. Ponto de coleta 2, período de cheia e de estiagem.



Figura 5. Ponto de coleta 3, foz do rio, não sofre grande influência com o período de estiagem. Sente-se maior influência da maré.

É importante ressaltar que em todas as áreas de coleta, há uma grande proximidade de locais habitados, onde pessoas têm contato direto e indireto com a água do rio, principalmente crianças. O Rio Anil tem um alto grau de poluição, notando-se a presença de plásticos, como garrafas PET.

Tabela 1. Resultados obtidos nas análises da água do Rio Anil.

Ponto	Nascente	Meio	Foz
Turbidez (JTU)	40	40	100
pH	6,0	6,0	7,0
Temp. (°C)	28	28	30
OD (mg L ⁻¹)	4,0	4,0	4,0
Nitrato (mg L ⁻¹)	5,0	<5,0	<5,0
Fosfato (mg L ⁻¹)	2,0	1,0	2,0

Os melhores cromatogramas para a análise do composto em estudo foram obtidos com comprimento de onda de 230 nm. Com relação às análises cromatográficas, primeiramente, testou-se a fase móvel metanol/H₂O na proporção 70:30 (v/v), onde o tempo de retenção observado para Bisfenol-A foi de cerca de 5 minutos, obtendo-se o seguinte cromatograma apresentado na Figura 6. Considerando-se que amostras de água natural, em geral, têm co-extrativos que são apresentados como picos no início dos cromatogramas, buscou-se um tempo de retenção maior, no sentido de se evitar interferências na análise das amostras reais. Deste modo, modificou-se a proporção da fase, obtendo-se um sistema de solventes composto por metanol: água, na proporção 65:35 (v/v), obtendo-se o cromatograma apresentado na Figura 7.

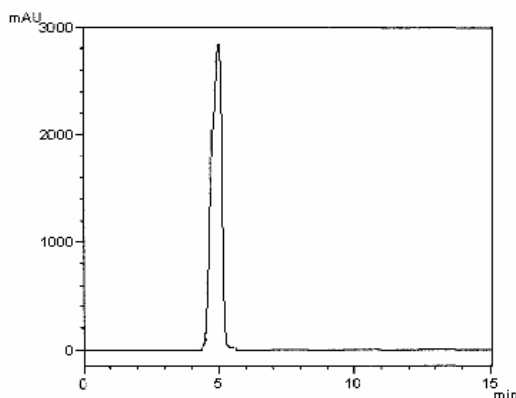


Figura 6. Cromatograma obtido pela injeção de 20µL de solução de Bisfenol-A em sistema cromatográfico composto por coluna C18, fase móvel Metanol/H₂O na proporção 70:30, monitorado em 230nm.

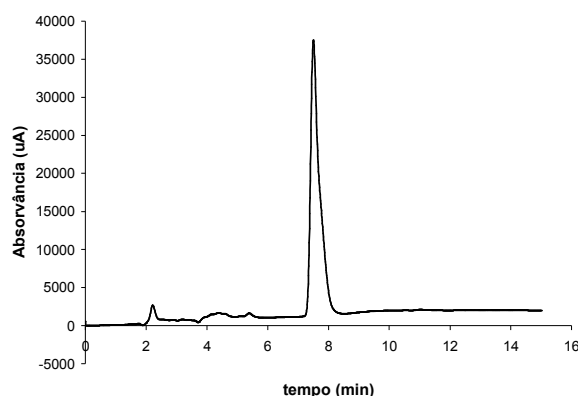


Figura 7. Cromatograma obtido pela injeção de 20 μ L de solução do padrão de bisfenol-A na concentração de 1,0 mg L⁻¹ em sistema cromatográfico composto por coluna C18, fase móvel Metanol/H₂O na proporção 65:35, 0,8 mL min⁻¹, monitorado em 230nm.

A curva analítica está apresentada na Figura 8. Observam-se excelentes coeficiente de correlação, que está relacionado à linearidade da faixa de trabalho, e coeficiente angular, relacionado à sensibilidade do método. Com relação ao teste de extração líquido-líquido não se obtiveram recuperações dentro dos valores estipulados na literatura para análise de resíduos (Brito e colaboradores, 2003). Deste modo, foram realizados estudos de recuperação com EFS. Os cromatogramas da amostra fortificada em 0,004 mg L⁻¹ e amostra de água do rio Anil são apresentados nas Figuras 9 e 10.

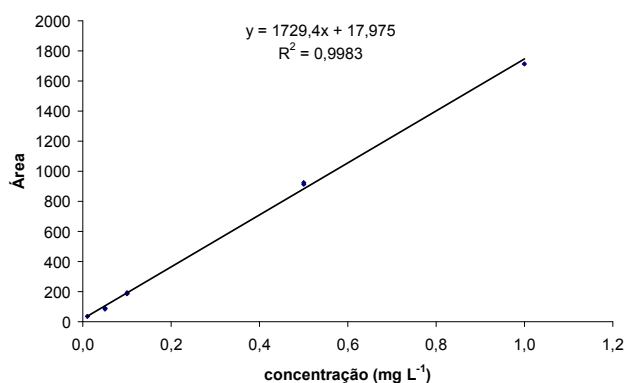


Figura 8. Curva analítica obtida pela injeção de padrões de bisfenol-A, na concentração de 0,01 a 1,0 mg L⁻¹.

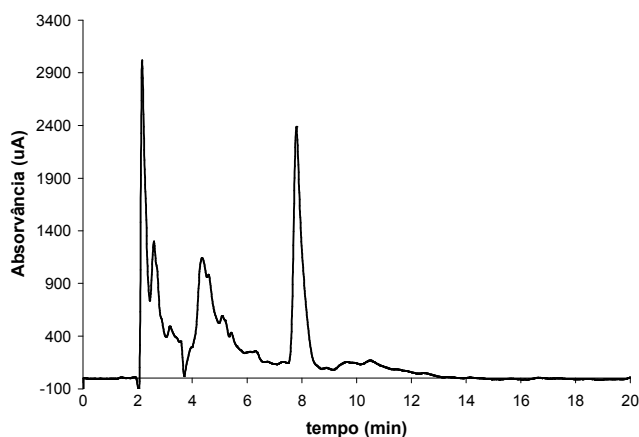


Figura 9. Cromatograma de amostra fortificada no nível de 0,004 mg L⁻¹.

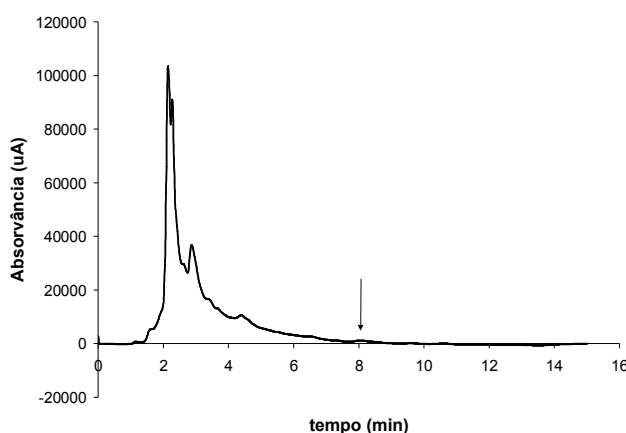


Figura 10. Cromatograma de amostra de água do rio Anil, ponto 1.

Através dos resultados das amostras fortificadas, analisadas em triplicata, obtiveram-se recuperação de 88% e coeficiente de variação (CV) de 14%. Todas as amostras de águas do rio Anil tiveram concentração inferior ao Limite de Quantificação (LQ = $0,001 \text{ mg L}^{-1}$), embora tenham apresentado picos no tempo de retenção do bisfenol-A.

Deste modo, percebe-se que este composto está presente nas amostras, mas não pode ser quantificado pelo método ora desenvolvido. Amostras de água mineral comercializadas em São Luís foram também analisadas e apresentaram concentração de bisfenol-A inferiores ao LQ. Cabe ressaltar que concentrações relativamente baixas deste composto são suficientes para apresentar efeitos deletérios sobre os organismos. Segundo a Resolução CONAMA 357 de 17 de março de 2005, o rio Anil pode ser considerado um rio de classe 3 onde, a quantidade máxima permitida de fenóis totais é de 0,01 mL.

5-CONCLUSÕES

O método analítico desenvolvido apresentou-se eficiente na determinação de bisfenol-A, rápido, de baixo custo, com bons resultados de recuperação, coeficiente de variação, linearidade do intervalo de trabalho e sensibilidade, embora o limite de quantificação não tenha sido suficiente para a determinação deste composto nas amostras investigadas, que apresentaram concentrações inferiores a este valor. Deste modo, faz-se necessário otimizar as condições analíticas para a determinação deste composto nos teores encontrados nestas amostras.

Outra possibilidade é o desenvolvimento de método baseado em cromatografia a gás, com detectores universais como o de ionização em chama, que podem garantir melhores limites de detecção e quantificação, entretanto, são mais laboriosos, resultando em maiores custos de análise.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AZEVEDO, D. DE A; LACORTE, S.; VIANA, P.; BARCELÓ, D. Occurrence of nonylphenol and bisphenol-A in surface waters from Portugal. *J Braz. Chem. Soc*, v. 12, n.4, p. 532-537, 2001.

AZEVEDO, D. DE A; LACORTE, S.; VIANA, P.; BARCELÓ, D. Occurrence of nonylphenol and bisphenol-A in surface waters from Portugal. *J Braz. Chem. Soc*, v. 12, n.4, p. 532-537, 2001.

BRAUNRATH, R; CICHNA, M. Sample preparation including sol-gel immunoaffinity chromatography for determination of bisphenol A in canned beverages, fruits and vegetables. **J. Chromatogr. A**, v. 1062, p. 189-198, 2005.

BRITO, N. M.; AMAANTE Jr., O. P. de; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Rev. Ecotoxicol. Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.

CASTRO, C.M.B. DE Perturbadores endócrinos ambiental: uma questão a ser discutida. **Engenharia e Ambiental**, v.7, n. 1-2, p. 4-5, 2002.

CETESB. MANUAL DE PRODUTOS QUÍMICOS PERIGOSOS: ficha de informação de produto químico [on line]. Disponível em :http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/produtos/ficha_completa.asp?consuta=BISF... Acesso em 26 de janeiro de 2005.

COELHO, A.J.M. Endocrine disruptores and dental materials: health implications associated with their use in Brasil. Cad. Saúde Pública, v.18, n.2, p.505-509, 2002.

GREENPEACE [on line]
<[HTTP://WWW.GREENPEACE.ORG.BR/TOXICOS/PDF/VENENODOMESTICO_RELATORIO.PDF](http://WWW.GREENPEACE.ORG.BR/TOXICOS/PDF/VENENODOMESTICO_RELATORIO.PDF)>
Acesso em 12 de Dez 2005.

JIN, et al.(2004). Determination of 4-terc-octylphenol, 4-nonyphenol and Bisphenol-A in surface waters from the Haihe river in Tianjin by gas chromatography-mass spectrometry with selected ion monitoring.

JUNKO SAJIKI, KATSUHIRO TAKAHASHI, JUN YONEKUBO: Sensitive method for determination of bisphenol-A in serum using two systems of high-performance liquid chromatography. Accepted in 7 october 1999.

NASCIMENTO FILHO, I. DO; VON MÜHLER, C.; CAMARÃO, E.B. Estudos de compostos orgânicos em lixiviado de aterros sanitários por EFS e CG/EM. **Quim. Nova**, v. 24, n.4. 554-556, 2001.

YEN SUN, MITSUHIRO WADA, OSAMA AL-DIRDASHI, NAOTAKA, HIRAJUKI AKAZAWA, KENICHIRO NAKASHIMA: High-performance liquid chromatography with peroxyoxalato chemiluminescence detection os bisfenol-A migrate from polycarbonate baby bottles using 4-(4,5-diphenil-1H-imidazol-2-yl) benzoyl chloride as a label.