

Otimização experimental e voltamétrica para a identificação e quantificação do desregulador endócrino Bisfenol A

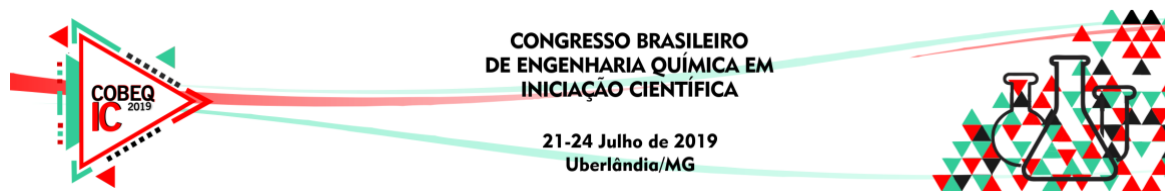
L. M. ANDRINO¹ e D. De SOUZA¹

¹ Universidade Federal de Uberlândia, Campus Patos de Minas
E-mail para contato: laviniandrino@hotmail.com

RESUMO – O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de metodologia analítica para a identificação e quantificação do desregulador endócrino Bisfenol A (BPA) e posterior aplicação em amostras de alimentos industrializados e armazenados em embalagens plásticas. Para isto, foram empregados métodos eletroanalíticos, nos quais as intensidades de sinais de correntes elétricas são empregadas para avaliação das concentrações de BPA e para avaliação da contaminação em alimentos industrializados armazenados em embalagens plásticas. O eletrodo sólido de amálgama de prata, será o sensor voltamétrico empregado, pois apresenta características semelhantes às do eletrodo de mercúrio, porém sem geração de resíduos tóxicos e com excelente reprodutibilidade nos sinais analíticos. A técnica analítica que será utilizada será a voltametria de onda quadrada, por ser, juntamente com o eletrodo sólido de amálgama de prata, uma junção que apresenta alta sensibilidade, seletividade, repetibilidade e reprodutibilidade. Os parâmetros experimentais (eletrólito de suporte e pH do meio) serão avaliados para obtenção de maior sensibilidade e seletividade. Além disto, os parâmetros da técnica de voltametria de onda quadrada também serão otimizados para obtenção de adequada sensibilidade e seletividade, além de estudos sobre mecanismo de reações químicas de BPA em diferentes tipos de amostras. Assim poderá ser possível avaliar se as embalagens estudadas apresentam limites aceitáveis para a presença de BPA, de acordo com o limite exigido pela legislação, e se ocorre contaminação dos alimentos por tempo de armazenamento e aquecimento.

1. INTRODUÇÃO

O Bisfenol A (BPA, ou 4,4-di-hidróxi-2,2-difenilpropano) é usado como monômero em vários polímeros para fabricação de resinas epóxi e policarbonatos, os quais podem ser empregados na fabricação de embalagens de bebidas e de alimentos. Assim, são usados em larga escala nas indústrias, pois apresenta baixo custo de produção e possui uma alta versatilidade e propriedades que conferem uma maior resistência, flexibilidade e estabilidade aos materiais. Deste modo, também é encontrado em diversas embalagens como, mamadeiras, embalagens retornáveis de água, cerveja e refrigerante. Além disso, está presente no revestimento de latas de conservas e frascos de alimentos para bebês. O BPA é um composto que possui elevada toxicidade, afetando a saúde humana de forma direta e indireta. Na forma, direta ocorre a contaminação pela ingestão de alimento contaminado, por exemplo o peixe que é contaminado por águas que contém o BPA, depositado por resquícios durante as fabricações



nas indústrias. Enquanto na forma indireta, ocorre a contaminação através da transferência do BPA da embalagem para o alimento, quando ocorre uma alteração na temperatura ou no tempo de armazenamento (SENCI, (2015)). A alta toxicidade do BPA, provoca riscos à saúde humana mesmo em doses baixas, causando efeitos adversos, como diabetes, câncer, obesidade, puberdade precoce, neurotoxicidade, doenças cardiovasculares, problemas no desenvolvimento e é um desregulador endócrino (RAGAVAN et al, (2013)).

Assim é evidente, a necessidade do desenvolvimento de metodologias para identificar com resultados satisfatórios, de forma simples, sensível, seletiva e confiável a determinação do BPA. Os métodos analíticos para a detecção do BPA são diversos, porém assim como os métodos cromatográficos eles possuem dificuldades para a sua execução como, a necessidade de um pré-tratamento das amostras, o preço elevado da instrumentação e materiais empregados, a necessidade de mão de obra altamente capacitada para a realização dos experimentos e o maior tempo necessário para a realização da análise química. Desse modo, foram desenvolvidos métodos eletroanalíticos para a análise que utilizam as medidas de propriedades elétricas das soluções nos quais existem dois principais tipos de medidas: galvanostáticas (medidas de potencial elétrico) e potenciostáticas (medidas de correntes elétricas) (WANG, (2006)).

O sucesso da eletroanálise é relacionado à escolha adequada do sensor voltamétrico, pois é nele que ocorre a reação redox de interesse (oxidação e/ou redução), o qual deverá ser escolhido, observando algumas características como custo de fabricação, propriedades mecânicas, toxicidade e disponibilidade do material, relacionando-o com o analito que será usado (WANG, (2006)). Sendo assim, o interesse nos eletrodos sólidos de amálgamas metálicas tem aumentado, já que é composto por uma liga, contendo mercúrio e um ou mais metais, mas possui propriedades eletroquímicas semelhantes às do mercúrio, porém não é tóxico, sendo uma das suas principais vantagens a estabilidade mecânica. Por isso, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento da metodologia eletroanalíticas para determinação de BPA empregando-se o eletrodo sólido de amálgama de prata (m-AgSAE), que apresenta uma facilidade na construção, rápida renovação da superfície e uma excelente reprodutibilidade (DE SOUZA *et al*, (2011)).

Para a verificação da aplicabilidade da metodologia desenvolvida, as amostras alimentícias serão avaliadas por meio da aplicação analítica realizada diretamente no alimento. As embalagens poliméricas, garantem a qualidade do produto durante o seu transporte e armazenamento. Porém, condições de armazenamento adversas podem gerar uma difusão de compostos da matriz polimérica para a matriz alimentícia, assim a embalagem deixa de exercer sua principal função de segurança para os alimentos e se torna um meio de transporte e difusão de substâncias tóxicas (STOFFERS, (2004)). Desta forma, serão analisadas as amostras observando os efeitos da potência e do tempo no micro-ondas, pois é por meio da radiação, em que ocorrer a transferência do BPA, após o aquecimento. Além disto, também serão avaliados alimentos armazenados e comercializados em embalagens plásticas, tais como água mineral, sucos e refrescos industrializados. De acordo com a Agência Nacional da Vigilância Sanitária (ANVISA), na resolução em que se refere as embalagens alimentícias, é definido um limite de migração específica (LME), para os principais constituintes nas embalagens plásticas que possuem teor tóxico. Nessa lista, um dos principais aditivos contidos é o BPA, um antioxidante que possui como LME (mg kg^{-1}) o valor máximo de $0,6 \text{ mg kg}^{-1}$.⁵ Dessa maneira, serão avaliados analiticamente várias amostras de alimentos e os resultados serão comparados para verificar também a qualidade de cada embalagem.

2. EXPERIMENTAL

A relação entre os parâmetros químicos e as medidas de corrente e potencial elétrico foram empregadas para identificação e quantificação do BPA. Para o uso de técnicas eletroanalíticas empregou-se uma célula eletroquímica, composta por um recipiente de vidro contendo três eletrodos (trabalho, referência e auxiliar), onde o eletrodo de trabalho foi o eletrodo sólido de amálgama de prata (AgSAE) que é onde ocorreu a reação redox de interesse (redução do BPA), o eletrodo de referência (Ag/AgCl 3,0 mol L⁻¹ de KCl) que fornece um potencial estável e reproduzível e com quem o potencial do eletrodo de trabalho é comparado, e o eletrodo auxiliar (fio de platina) que que auxilia no transporte da corrente (DE SOUZA *et al*, (2004)).

Todas as soluções foram preparadas utilizando a massa adequada ou o volume adequado de cada um dos reagentes analíticos de alta pureza, as quais foram: solução tampão Clark e Lubs, Tris cloridrato, Tetraborato, tampão fosfato, tampão Brinton-Robinson (BR), hidróxido de sódio e tampão fosfato-salino (PBS). Para o preparo das soluções foram utilizados, vidrarias comuns que foram lavadas com água da torneira, sabão, álcool e por último enxaguadas com água purificadas com um Sistema Purificador de água Osmose Reversa OS50 LX. Além disso, utilizou-se uma balança analítica classe I (Bel Engineering, M214A) com precisão de 0,0001g e o pHmêtro de bancada Mpa-210 (MS TECNOPON Instrumentação). Na realização dos experimentos o equipamento utilizado foi um Potenciostato/Galvanostato microAutolab III Metrohn-Pensalab, sendo controlado pelo software NOVA® 2.1, também da Metrohn-Pensalab.

Neste trabalho empregou-se a voltametria de onda quadrada (VOQ), onde a variação de potencial elétrico é realizada na forma de uma escada e as medidas da corrente são realizadas antes e depois de aplicar o pulso de potencial. Foi empregada esta técnica por ser uma das técnicas de pulso mais rápidas e sensíveis (DE SOUZA, (2004)). Antes de iniciar os experimentos de SWV, o AgSAE é polido em uma lixa de granulação 1500, para retirar qualquer resíduo. Após isto é lavado junto com os demais eletrodos e a célula eletroquímica e, pregando-se água e sabão neutro, seguidos de enxague com etanol e por fim água purificada. Primeiramente, coloca-se na célula uma solução 0,2 mol L⁻¹ de KCl, juntamente com os eletrodos e realiza-se o condicionamento eletroquímico do AgSAE aplicando-se -2,2 V por 600 segundos, seguidos por experimentos de Voltametria Cíclica com o eletrólito de suporte, para ocorrer uma adaptação da superfície a soluções muito distintas. Após a Voltametria Cíclica no eletrólito de suporte, inicia-se a SWV aplicando um potencial de -2,20 V em um tempo de 30 s entre cada experimento, promovendo-se assim completa renovação da superfície do AgSAE. Antes de iniciar as adições do Bisfenol A, sempre foi feito o branco, em que fez a SWV para verificar se o eletrodo estava limpo e sem contaminação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a construção e ativação do AgSAE, iniciou-se os experimentos para otimização experimental onde foram avaliados alguns eletrólitos de suporte observando-se em que meio era possível obter maior intensidade de pico de redução (aumentando-se a sensibilidade) e com pico mais estreito (melhorando a seletividade) e também com o potencial de redução mais próximo de zero (mais favorável). Assim avaliou-se o eletrólito de suporte que melhor se

identificou aos requisitos, considerando-se três soluções com valores similares de pH, onde-se observou-se que entre as soluções de tampão amônio, BR e PBS, todos com pH = 9,0, a melhor resposta voltamétrica foi obtida em meio de tampão fosfato-salino (PBS), como pode ser visualizado na Figura 1.

Nas três soluções tampão, o Bisfenol A apresentou pico de redução bem definido, entretanto em meio de tampão PBS, o pico voltamétrico apresentou maior linearidade com o aumento de concentração e menor valor de potencial de redução, sendo mais adequado para o desenvolvimento da metodologia. Considerando-se o eletrólito tampão amônio, observa-se que não houve crescimento linear do sinal com a concentração e pico voltamétrico apresentou valor mais negativo que o do tampão PBS. Já em meio de solução tampão BR ocorreu um crescimento intensidade de corrente acompanhado por intenso deslocamento e alargamento do pico voltamétrico, o que não ocorreu no tampão PBS. Assim, variou-se o pH da solução tampão PBS, onde observou-se que quanto menor o valor de pH, maior a intensidade de sinal voltamétrico obtido, como está mostrado na Figura 2.

Figura 1: Voltamogramas de onda quadrada para a redução de diferentes concentrações de Bisfenol A sobre AgSAE em diferentes eletrólitos de suporte, $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = -2 \text{ mV}$ e $a = -50 \text{ mV}$.

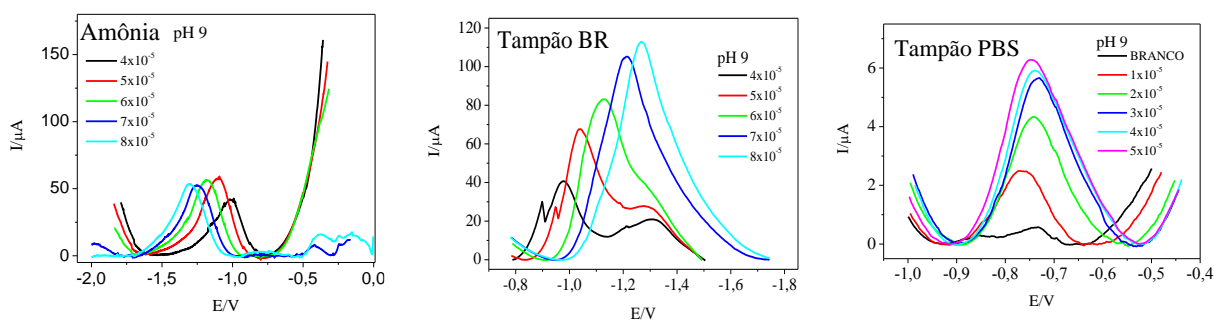
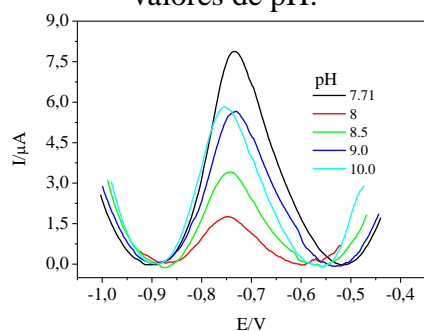


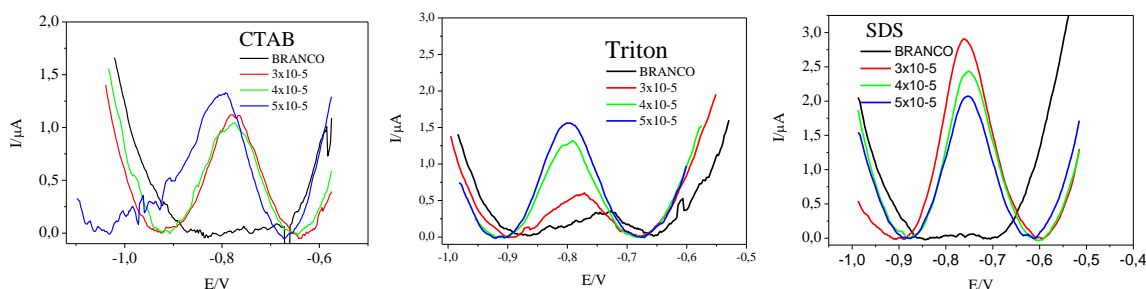
Figura 2: Voltamogramas de onda quadrada para a redução de $3,0 \times 10^{-5} \text{ M}$ de Bisfenol A, sobre AgSAE em tampão PBS, com $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = -2 \text{ mV}$ e $a = -50 \text{ mV}$ e diferentes valores de pH.



A fim de aumentar a sensibilidade e a seletividade do método, variou-se alguns parâmetros. Primeiramente testou a influência de surfactantes (catiônico, neutro e aniônico), com o uso de brometo de cetil trimetil amônio (CTAB), Triton X-100 (Triton) e lauril sulfato

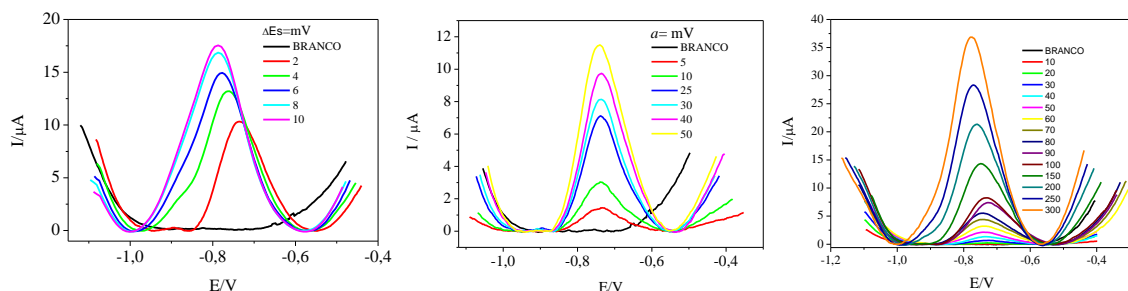
de sódio (SDS), respectivamente. Foram avaliados, porém não obteve melhor repetibilidade, reprodutibilidade e intensidade de sinal analítico, como é mostrado na Figura 5.

Figura 5: Voltamogramas de onda quadrada para a redução de $3,0 \times 10^{-5}$ M de Bisfenol A sobre AgSAE em tampão PBS em pH 7,71 com $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = -2 \text{ mV}$ e $a = -50 \text{ mV}$, empregando-se diferentes surfactantes.



Posteriormente avaliou-se os parâmetros da SWV para obter um método mais sensível e seletivo. Primeiramente, foi avaliado o incremento de varredura de potencial de -2 mV a -10 mV , observando que o sinal analítico aumentou proporcionalmente com o aumento do incremento, porém o pico voltamétrico se deslocou para valores mais negativos, acompanhados de maior largura do pico, indicando perda da seletividade analítica, como pode ser observado na Figura 6. A amplitude dos pulsos de potencial foi avaliada de -5 mV a -50 mV , onde foi observado que o aumento de a promoveu aumento proporcional nos valores de corrente sem alteração nos potenciais de pico e na largura dos voltamogramas, como mostrado na Figura 6. A frequência de aplicação dos pulsos de potencial foi variada de 10 s^{-1} a 300 s^{-1} , observando que o sinal da corrente aumentou com o aumento no valor de f , conforme observado na Figura 6.

Figura 6: Voltamogramas de onda quadrada para a redução de $3,0 \times 10^{-5}$ M de Bisfenol A sobre AgSAE, com $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 5 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = -2 \text{ mV}$. Variação individual de cada um dos parâmetros da VOQ.



A avaliação de todos os parâmetros voltamétricos para se empregar uma metodologia mais sensível e seletiva mostrou que com amplitude de -50 mV , incremento de varredura de potenciais de -10 mV e frequência de pulsos de potencial de 300 s^{-1} , são adequados, porém ao construir as curvas analíticas empregando-se estes parâmetros observou-se um aumento

exacerbado de ruídos de fundo, os quais prejudicaram a metodologia proposta. Assim, novas curvas analíticas foram construídas utilizando-se amplitude de -50 mV , incremento de -2 mV e a frequência de 100 s^{-1} . Desta maneira, curvas de calibração foram construídas empregando-se adições sucessivas do Bisfenol A em intervalo de concentração de $1,00 \times 10^{-7}$ a $1,00 \times 10^{-6}\text{ mol L}^{-1}$ em uma solução de tampão PBS pH 7,71, onde observou-se aumento linear das correntes de pico com o aumento da concentração de Bisfenol A, indicando que o método proposto é sensível e poderá ser empregado com sucesso para a detecção em amostras de alimentos.

4. CONCLUSÃO

Devido a gravidade do Bisfenol A à saúde da população é de extrema importância aplicar esta metodologia e avaliar os possíveis interferentes em amostras complexas, como alimentos industrializados aquecidos e armazenados em embalagens plásticas contendo Bisfenol A. A metodologia proposta apresentou sensibilidade adequada, com boa seletividade, reprodutibilidade e repetibilidade, minimizando-se assim os custos nas análises e o tempo necessário para a obtenção da informação analítica.

5. REFERÊNCIAS

- DE SOUZA, D. et al. *Voltametria de onda quadrada. Segunda parte: aplicações*. Química nova, v. 27, n. 5, p. 790-797, out./jan. 2004.
- DE SOUZA, D., et al. Utilização de eletrodos sólidos de amálgama para a determinação analítica de compostos orgânicos e inorgânicos. Química Nova, v. 34, n.03. p.487-496, 2011.
- RAGAVAN, K. V et al. Sensors and biosensors for analysis of bisphenol-A. Trends in Analytical Chemistry, v.52, p.248-260, 2013.
- SENCI, R. Efeitos do bisfenol A: um desregulador endócrino. Assis, 2015. Monografia (Bacharel em Química). Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis, Fundação Educacional do Município de Assis.
- STOFFERS, N. Certified reference materials for food packaging specific migration tests: development, validation and modelling. Wageningen, 2004. Monografia (Ph.D., embalagens – interação alimentar). Universidade de Wageningen.
- WANG, Joseph. *Analytical Electrochemistry*. 3. ed. New Jersey: Wiley-vch, 2006. 250 p.