

Caracterização de taninos naturais e sintéticos: presença de bisfenol A, bisfenol F e bisfenol S.

Por Daniela Caracciolo, Coordenadora Técnico-Científica do Departamento de Tecnologias Ambientais da SSIP (Stazione Sperimentale per l'Industria delle Pelli e delle Materie Concianti)

O Bisfenol A (BPA, no. CAS: 80-05-7) é um produto de síntese da reação entre dois fenóis e uma molécula de acetona utilizado na produção de plásticos de policarbonato (muito popular devido às propriedades de transparência, resistência térmica e mecânica), usado em recipientes de uso alimentício e nas resinas epóxi que compõem o revestimento protetor interno encontrado na maioria das latas de alimentos e bebidas, bem como no papel térmico de recibos e em aparelhos odontológicos. Devido a dúvidas sobre seus efeitos na saúde humana, no entanto, seu uso tem sido gradualmente limitado: desde 2009 foi incluído na lista de substâncias proibidas em produtos cosméticos (Regulamento (CE) 1223/2009) e desde 2011 seu uso foi proibido para a produção de mamadeiras em policarbonato (Regulamento (UE) 321/2011).

Com a classificação em 2017, de acordo com os critérios do Regulamento Europeu de Produtos Químicos REACH, do BPA como tóxico para a reprodução (categoria 1B) e interferente endócrino (DE) foi colocado entre as SVHCs (substâncias de preocupação relevante), com o consequente limite de 0,02% em peso em papel térmico (Entrada 66 Anexo XVII Reach). Essas restrições levaram os fabricantes a substituir o BPA por substâncias estruturalmente semelhantes, ou outros bisfenóis, que de fato desempenham uma função semelhante nos materiais em que são utilizados. Atualmente, esses bisfenóis alternativos não são classificados como ED, embora estejam em andamento vários estudos e até solicitações regulatórias, em pé de igualdade com o bisfenol A, como, por exemplo, no pedido apresentado pela Alemanha à ECHA em 2020.

Por estas razões, o BPA está presente em inúmeras especificações dos clientes dos curtumes e nos MRSLs da ZDHC, bem como na lista de sensibilizadores cutâneos, para os quais está pendente um pedido de restrição junto à ECHA. O BPA é uma substância que não deveria estar presente no couro e tampouco nos produtos utilizados no seu ciclo de industrialização porque não faz parte do ciclo de produção. Por outro lado, alguns outros bisfenóis, que atualmente não estão sujeitos a nenhuma restrição, estão presentes em alguns recorrentes sintéticos porque são monômeros envolvidos na polimerização ou reação de produto secundário. Como ainda não existe um método oficial para determinar a quantidade de bisfenóis presentes no couro, bem como em produtos químicos, antes de caracterizar alguns taninos sintéticos e taninos naturais quanto à possível presença de bisfenóis A, S e F, surgiu a necessidade de identificar a técnica ideal.

Alguns estudos publicados nos últimos anos para a determinação do bisfenol A e seus análogos envolvem o uso de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa simples ou em *tandem* (LC/MS, LC-MS/MS) (Rahman, Olusayo, & Pang, 2021) ou cromatografia líquida acoplada a um detector de fluorescência (HPLC-FLD) (Mahmoud, 2021).

No nosso caso, foi utilizado um método analítico *ad hoc* simples e eficaz para a análise dos taninos. O procedimento analítico envolveu análise qualitativa e quantitativa por meio da utilização de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector UV (HPLC-UV) e análise qualitativa por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de massa (HPLC-MS).

A atividade experimental destinada a identificar os bisfenóis A, F e S eventualmente presentes nas nove amostras de taninos naturais e sintéticos foi dividida nas seguintes fases:

Fase I: Preparação das amostras

Fase II: Análise HPLC-UV

Fase III: Análise HPLC-MS

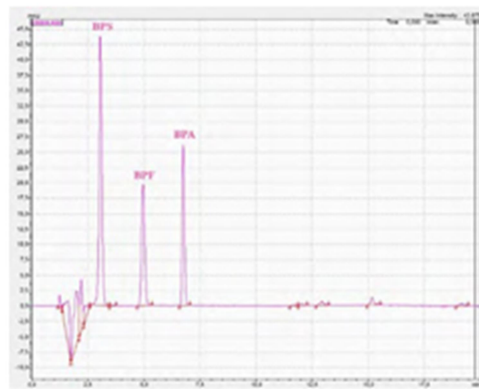
Diferentes amostras de taninos vegetais e taninos sintéticos produzidos e comercializados foram utilizados neste estudo. Foram analisadas nove amostras de taninos diferentes. Os taninos naturais caracterizados são: castanheiro, gambier, quebracho, mimosa e tara, enquanto que os taninos sintéticos caracterizados são taninos em pó do tipo fenólico, taninos líquidos à base de naftaleno e taninos em pó à base de difenilsulfona.

Compostos fenólicos complexos, como taninos, são solúveis em solventes polares como água (especialmente em água quente), metanol, etanol e acetona. Sepperer *et al* (Sepperer & Tondi, 2018) calculou a solubilidade de extratos de tanino em diferentes solventes (água, aceto nitrila, metanol, etanol, 2-propanol, acetona, diclorometano). Seu estudo demonstrou que é possível separar o extrato de tanino industrial usando vários solventes orgânicos de diferentes polaridades. Uma separação mais significativa foi alcançada pela acetona seguida de etanol, aceto nitrila e metanol. No nosso caso foram seguidas as diretrizes indicadas pela Comissão CEN/TC 289. Na FASE I, as amostras de taninos vegetais e sintéticos foram preparadas realizando uma extração ultrassônica com metanol. Esses extratos foram analisados em HPLC-UV e HPLC-MS.

Para a análise HPLC-UV, foi utilizado um HPLC com uma coluna C18 de fase reversa. Uma rampa de gradiente de concentração de água e ácido fórmico a 0,1% e aceto nitrila foi utilizada como fase móvel. A leitura é realizada a 235 nm e 280 nm. Os picos dos bisfenóis A, F e S têm tempos de retenção de 6,92 min, 5,11 min e 3,15 min. Para a análise LC-MS, o modo de íon negativo ESI foi usado para ionizar os bisfenóis. Utilizando água/aceto nitrila como fase móvel de acordo com a rampa de gradiente de concentração descrita abaixo.

| N° | Tempo | %Acetonitrile |
|----|---------|---------------|
| 1 | 0 | RUN |
| 2 | 0 a 10 | 40 a 100 |
| 3 | 10 a 16 | 100 |
| 4 | 16 a 18 | 100 a 40 |
| 5 | 20 | STOP RUN |

Rampa di gradiente di concentrazione dell'HPLC-UV



Cromatogramma della standard multicomponente di BPA, BPF e BPS pari a 10 ppm

| N° | Tempo | Flusso [ml/min] | % Acqua | % Campione | % Acetonitrile |
|----|--------|-----------------|---------|------------|----------------|
| 1 | 0.000 | | | | RUN |
| 2 | 0.000 | 0.300 | 60 | 0 | 40 |
| 3 | 11.000 | 0.300 | 5 | 0 | 95 |
| 4 | 15.000 | 0.300 | 5 | 0 | 95 |
| 5 | 20.000 | 0.300 | 60 | 0 | 40 |
| 6 | 20.000 | | | | STOP RUN |

Rampa di gradiente di concentrazione dell'HPLC-MS

Gli ioni prodotti dai bisfenoli, che contengono una o più catene alchiliche legate all'atomo di carbonio

Rampa de gradiente de concentração do HPLC-UV

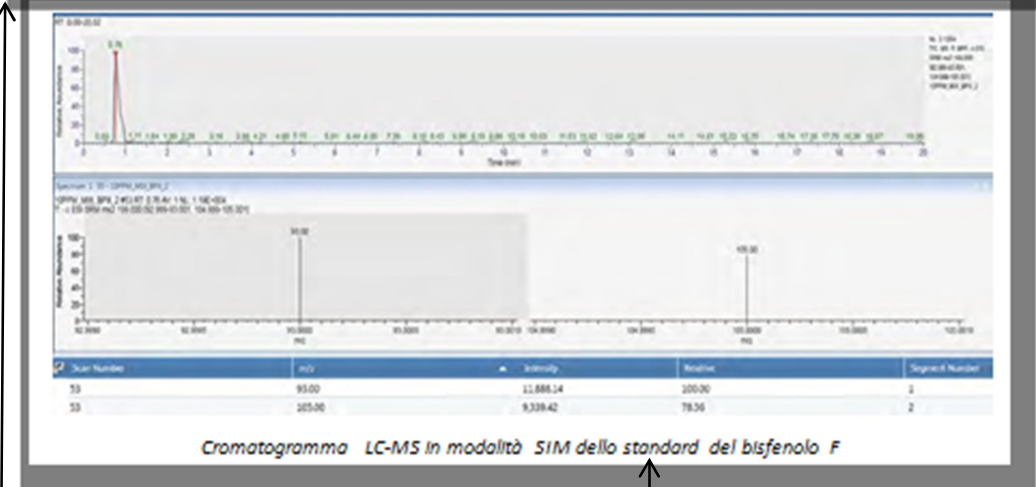
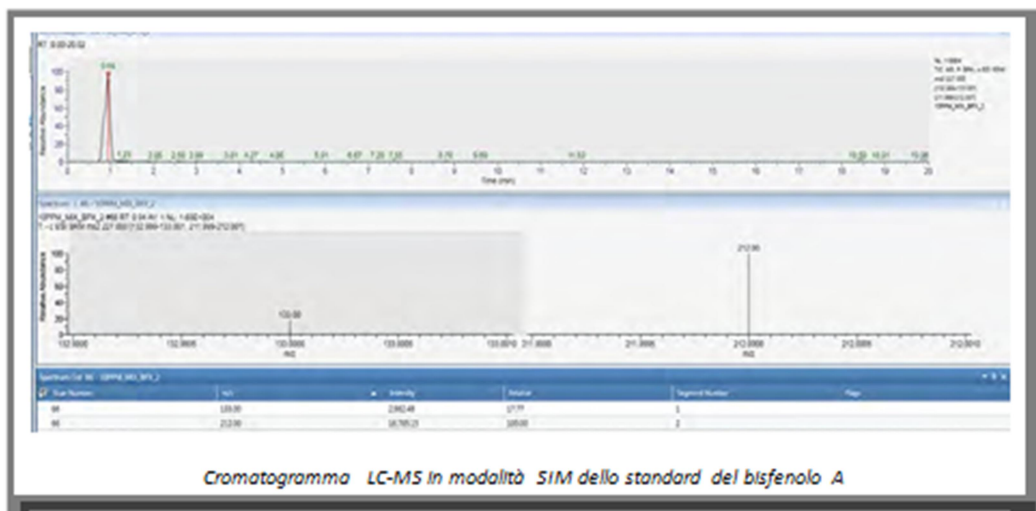
Rampa de gradiente de concentração do HPLC-MS

Os íons produzidos pelos bisfenóis, que contêm uma ou mais cadeias alquílicas ligadas ao átomo de carbono.

Cromatogramma do padrão multicomponente de BPA, BPF e BPS igual a 10 ppm

Os íons produzidos pelos bisfenóis, que contêm uma ou mais cadeias alquílicas ligadas ao átomo de carbono central caracterizam-se pela perda radical desses grupos. O BPA caracteriza-se pela perda de uma metila. Para compostos como o BPF, que não contém a cadeia alquílica no carbono central (o BPF contém dois átomos de hidrogênio no carbono central), o principal íon produzido deve-se à clivagem da ligação hidroxifenil-alquila produzindo um íon em m/z 93,0 $[C_6H_5O]^-$. Para o BPS, que contém um átomo de enxofre ao invés de um átomo de carbono como átomo-ponte, o íon mais abundantemente produzido em m/z 107,9 resulta da perda consecutiva do grupo hidroxifenil e do grupo óxido de enxofre $[M-H-C_6H_5OSO_2]^-$ - (Leitner, 2018).

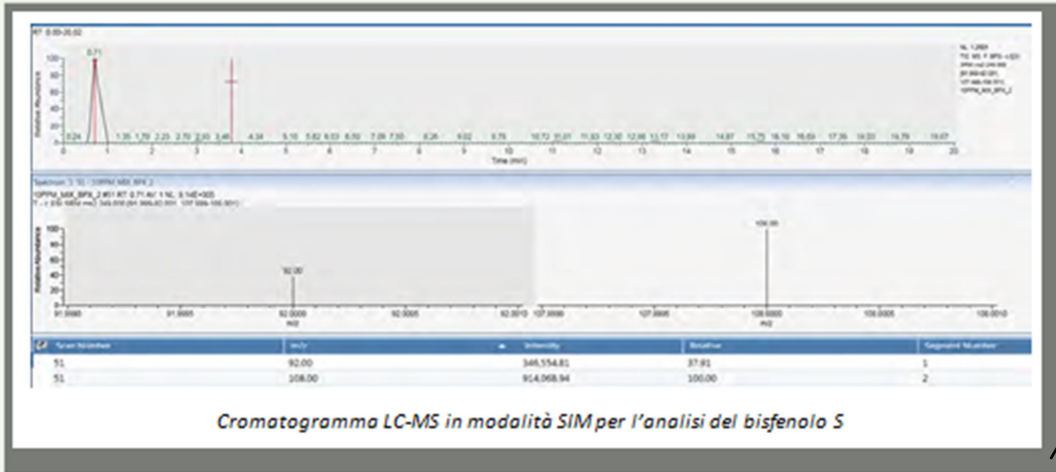
A Figura 42 abaixo mostra o espectro de massa do bisfenol A, caracterizado no minuto 0,94 pelo sinal, em relação a m/z 133 e m/z 212, com intensidade relativa de 17,77 e 100,00 respectivamente.



Cromatogramma LC-MS no modo SIM do standard do bisfenol A

Cromatogramma LC-MS no modo SIM do standard do bisfenol F

O espectro de massa do bisfenol F é mostrado na próxima figura. Caracteriza-se no minuto 0,76 por sinais relativos a m/z 93 e m/z 105, com intensidade relativa de 100,00 e 78,56 respectivamente. O espectro de massa do bisfenol S é mostrado na figura seguinte. Caracteriza-se no minuto 0,71 por sinais relativos a m/z 92 e m/z 108, com intensidade relativa de 37,91 e 100,00 respectivamente. Os resultados obtidos da atividade analítica realizada em amostras comerciais de taninos sintéticos e naturais são apresentados a seguir de forma esquemática.



Cromatograma LC-MS in modalità SIM per l'analisi del bisfenolo S

| TIPOLOGIA TANNINO | BPA | BPF | BPS |
|---------------------------------|-----|-----|-----|
| DIIDROSSIDIFENILSULFONE conc. | - | - | SI |
| DIIDROSSIDIFENILSULFONE polvere | - | - | SI |
| FENOLICO | - | - | - |
| NAFTALENICO | - | - | - |
| CASTAGNO | - | - | - |
| GAMBIER | - | - | SI |
| MIMOSA | - | - | - |
| QUEBRACHO | - | - | - |
| TARA | - | - | SI |

Cromatograma LC-MS no modo SIM para a análise do bisfenol S

- TIPOLOGIA DO TANINO
- Diidroxifenilsulfona conc.
- Diidroxifenilsulfona pó
- Fenólico
- Naftalênico
- Castanheiro
- Gambier
- Mimosa
- Quebracho
- Tara

Bisfenol A Bisfenol F Bisfenol S

Rahman, M. S., Olusayo, A. E., & Pang, M. (2021). Drivers of owning more BPA. *Journal of Hazardous Materials*

Mahmoud, S. &.-E. (2021). High-Performance Liquid Chromatography Method for Simultaneous Determination of Bisphenols in Plastic Packed Dry Fruits Using Multiwalled Carbon Nanotubes as Solid Phase Extraction Sorbent. *Current Analytical Chemistry*.

Sepper, T., & Tondi, G. (2018). Fractioning of Industrial Tannin Extract in Different Organic Solvents.