

PARTE II - MATERIAIS E MÉTODOS

PARTE II – MATERIAIS E MÉTODOS

1. QUESTIONÁRIO

Foi elaborado um questionário preliminar e aplicado a uma amostra de 15 mães de crianças em idade de utilizar biberões.

Este questionário preliminar foi distribuído em farmácias da zona da grande Lisboa e preenchido no momento pela própria mãe. Posteriormente foi corrigido, de forma a tornar-se mais completo e de fácil interpretação (Anexo I). Foi novamente aplicado às mães de crianças em idade de utilizar biberões; o questionário foi distribuído em farmácias e infantários da zona da grande Lisboa e preenchido no momento pela própria mãe.

Foram recolhidos 42 questionários válidos e efectuada a análise estatística dos resultados.

2. ANÁLISE DO BISFENOL A

2.1. REAGENTES

- ⇒ Bisfenol A 99% Aldrich (EEC number 201-245-8; CAS number 80-05-7).
- ⇒ Metanol para cromatografia líquida Merck (Darmstadt, Germany)
- ⇒ Ácido acético glacial 100% p.a. Merck (Darmstadt, Germany).
- ⇒ Água desionizada.

2.2. MATERIAIS E EQUIPAMENTO

- ⇒ Copo pirex 3 L e 5 L.
- ⇒ Escovilhão para lavagem de biberões Chicco.
- ⇒ Placa de aquecimento eléctrica J.P. Selecta S.A. Agimatic N 640 W (Barcelona, Spain).
- ⇒ Placa de aquecimento eléctrica Cenco Cat nº 34530 600 W (Breda, The Netherlands).
- ⇒ Estufa Horo.
- ⇒ Espectrofotómetro de Fluorescência Hitachi F2000.
- ⇒ Potenciómetro Orion Research Model 701/ digital pHmeter com eléctrodo para medição do pH Crison cat n.º 52-00.
- ⇒ Desionizador Milli-Q® Water purification system, Millipore (Bedford, Massachusetts).
- ⇒ Equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) *Agilent 1100 series* equipado com detector de fluorescência e UV-vis e uma válvula injectora *Rheodyne Modelo 7725i*.
- ⇒ Seringa para injeção de amostras em HPLC Agilent (Austrália).
- ⇒ Material laboratorial de uso corrente.

2.3. CONDIÇÕES PARA DETECÇÃO DO BISFENOL A POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A pesquisa de bisfenol A foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa com detecção por fluorescência.

Utilizou-se um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência *Agilent 1100 series* equipado com uma válvula injectora *Rheodyne Modelo 7725i*, com um loop de 500µL.

A fase estacionária foi uma coluna para cromatografia *RP18 Lichrospher® 100 Lichocart® 125-4* (Merck; Darmstadt Germany) com uma pré-coluna *Purospher® Star RP-18e 5µm Lichrocart® 4-4* (Merck; Darmstadt Germany).

A detecção foi feita com um detector de fluorescência *Agilent Series 1100 FLD* com comprimento de onda de excitação 280 nm e emissão 317 nm.

A fase móvel foi um gradiente de metanol e água que variou ao longo da corrida (50 até 90%) tal com descrito na tabela 1 e cujo o fluxo se manteve constante a 1 mL/min.

Tabela 1 – Gradiente de metanol e água utilizado como fase móvel para detecção do bisfenol A por HPLC

Tempo (minutos)	Metanol (%)	Água (%)
0,0	50	50
8,0	90	10
8,1	50	50
10,0	50	50

Para as condições descritas o tempo médio de retenção do bisfenol A é de $6,03 \pm 0,14$ min.

3. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA OS ESTUDOS DE MIGRAÇÃO

3.1. ESTUDO PRELIMINAR

Foi realizada uma análise preliminar para seleccionar as marcas de biberões a incluir no estudo. As condições seleccionadas basearam-se na NE 13130 - Parte 1.

Foram adquiridos em hipermercados e farmácias da zona da grande Lisboa, biberões de plástico de 7 marcas diferentes e anotada a sua capacidade volumétrica.

- 1) Os biberões foram lavados, de acordo com as especificações do fabricante, em água corrente com detergente de loiça convencional (pH = 6,7) e escovilhão, posteriormente foram esterilizados em água a ferver durante 10 minutos.

- 2) Os biberões foram cheios até ao limite da sua capacidade com água desionizada a 100°C.
- 3) Foram tapados com um vidro de relógio para prevenir evaporação do simulador.
- 4) Permaneceram em estufa a 100°C ($\pm 3^\circ\text{C}$) durante 30 minutos (± 1 min).
- 5) Os passos de enchimento com água desionizada e permanência na estufa a 100°C por 30 minutos foram repetidos mais duas vezes (de cada vez com novo simulador).
- 6) O simulador foi recolhido para um matraz de vidro no fim do 3º ensaio e guardado à temperatura ambiente, ao abrigo da luz para posterior análise por HPLC.

3.2. ESTUDO DE MIGRAÇÃO A 40°C DURANTE 24 HORAS COM ÁGUA DESIONIZADA

As condições de migração estabelecidas para este estudo foram seleccionadas de acordo com a NE 14350 – Parte 2.

Foram adquiridos em hipermercados e farmácias da zona da grande Lisboa 3 biberões de 6 marcas diferentes incluídas no estudo preliminar (marca A, B, C, D, E e F).

- 1) Os biberões foram tratados de acordo com as especificações da NE 14350 – Parte 2; foram colocados em água a ferver durante 10 minutos.
- 2) Foram cheios com 100 ml de água desionizada e cobertos com um vidro de relógio, para prevenir evaporação do simulador.
- 3) Posteriormente foram colocados na estufa a 40°C durante 24 horas.
- 4) Após as 24 horas o simulador foi recolhido num matraz de vidro e guardado à temperatura ambiente, ao abrigo da luz para posterior análise por HPLC.

3.3. ESTUDO DE MIGRAÇÃO A 100°C DURANTE 30 MINUTOS COM ÁGUA DESIONIZADA

As condições seleccionadas para este estudo basearam-se na NE 13130 - Parte 1.

Foram adquiridos em hipermercados e farmácias da zona da grande Lisboa 6 biberões de cada uma das 6 marcas incluídas no estudo (marca A, B, C, D, E e F).

Os biberões foram sujeito ao procedimento descrito no ensaio preliminar (3.1) tendo sido repetidos os passos 1), 2), 3), 4), o procedimento seguinte foi:

- 5) Os passos de enchimento com água desionizada e permanência na estufa a 100°C por 30 minutos foram repetidos mais três vezes (de cada vez com novo simulador).

Procedeu-se então à recolha da amostra tal como descrito na alínea 6) do estudo preliminar (3.1).

3.4. ESTUDO DE MIGRAÇÃO A 100°C DURANTE 4 HORAS COM ÁGUA DESIONIZADA

Tal como no estudo anterior as condições seleccionadas basearam-se na NE 13130 - Parte 1.

Foram adquiridos em hipermercados e farmácias da zona da grande Lisboa 3 biberões de cada uma das 6 marcas incluídas no estudo (A, B, C, D, E e F).

Repetiu-se o procedimento já descrito anteriormente no estudo preliminar (3.1) alíneas 1), 2), 3) e posteriormente:

- 4) Os biberões foram colocados na estufa a 100°C ($\pm 3^\circ\text{C}$) durante 4 horas (± 9 min)
- 5) Os passos de enchimento com água desionizada e permanência na estufa a 100°C por 4 horas foram repetidos mais três vezes (de cada vez com novo simulador).

De seguida repetiu-se o procedimento descrito na alínea 6) do estudo preliminar (3.1)

3.5. ESTUDO INTRAMARCA

Foram adquiridos num hipermercado da zona da grande Lisboa 8 biberões de uma das seis marcas incluídas no estudo (marca F). Foi registada a sua capacidade e o seu número de lote.

Foi realizado o mesmo procedimento descrito para o estudo preliminar (3.1).

3.6. ESTUDO DE MIGRAÇÃO A 100°C DURANTE 30 MINUTOS COM ÁCIDO ACÉTICO

As condições seleccionadas para este estudo basearam-se também na NE 13130 - Parte 1.

Foram adquiridos num hipermercado da zona da grande Lisboa 3 biberões de uma das seis marcas incluídas no estudo (marca B).

Repetiu-se o procedimento descrito no estudo preliminar (3.1) mas usando como simulador ácido acético 3% em vez de água desionizada.

3.7. ESTUDO MIMETIZANDO CONDIÇÕES REAIS DE UTILIZAÇÃO REPETIDA

Foram adquiridos numa farmácia da zona da grande Lisboa 3 biberões de uma das seis marcas incluídas no estudo (marca C).

Neste estudo repetiu-se o passo descrito no estudo preliminar (3.1) alínea 1) e seguidamente:

- 2) Os biberões foram cheios com 280 ml (75% da sua capacidade) de água desionizada a 100°C, permaneceram em repouso até atingirem 50°C ($\pm 5^\circ\text{C}$).
- 3) Foram então agitados durante dois minutos.
- 4) Deixou-se arrefecer até 30°C ($\pm 5^\circ\text{C}$)
- 5) Posteriormente cronometraram-se 20 minutos (± 5 minutos) tendo o simulador sido recolhido para um matraz de vidro e analisado por HPLC.

Este procedimento foi repetido 25 vezes e recolhidas amostras para análise ao fim de 1,2,3,5,10,15,18,20 e 25 repetições.