



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
QMC5515 – Estágio Supervisionado

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO DESENVOLVIDO NA
EMPRESA DUAS RODAS EM JARAGUÁ DO SUL, SC**

JOÃO GABRIEL MORITZ LIMA

Florianópolis
Agosto/2021

João Gabriel Moritz Lima

**ADAPTAÇÃO DE UMA METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE
BENZO(A)PIRENO EM AROMA DE FUMAÇA POR CG/EM E VALIDAÇÃO
DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE TEOR DE ÁCIDO
ACÉTICO EM VINAGRE DE MAÇÃ POR CLAE-DAD**

Relatório de Estágio apresentado ao
Departamento de Química da
Universidade Federal de Santa Catarina
desenvolvido na Duas Rodas em
Jaraguá do Sul/SC, como requisito da disciplina
Estágio Supervisionado (QMC 5515).

Prof^a IOLANDA DA CRUZ VIEIRA

Orientadora



CLAUDIO ROBERTO LOPES DE SOUZA

Supervisor

JOÃO GABRIEL MORITZ LIMA

Estagiário

Florianópolis
Agosto/2021

SUMÁRIO

1. JUSTIFICATIVA.....	11
2. APRESENTAÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO.....	12
3. REVISÃO DA LITERATURA REFERENTE AO TRABALHO DESENVOLVIDO.....	13
3.1 Introdução à cromatografia.....	13
3.2. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos e Benzo(A)Pireno na alimentação humana.....	18
3.3. Vinagre, teor de Ácido Acético e suas utilidades.....	20
3.4. Validação de metodologia e parâmetros para validação.....	20
4. OBJETIVOS.....	23
4.1 Objetivo Geral.....	23
4.2 Objetivos específicos.....	23
<i>4.2.1 Adaptação de Metodologia para Análise de Benzo(a)pireno em Aroma de Fumaça por CG/EM.....</i>	<i>23</i>
<i>4.2.2 Validação de Metodologia de Determinação de Teor ácido acético em Vinagre de Maçã por CLAE-DAD.....</i>	<i>23</i>
5. METODOLOGIA.....	24
5.1 Reagentes.....	24
5.2 Equipamentos.....	24
5.3 Adaptação de Metodologia para Análise de Benzo(a)pireno em Aroma de Fumaça por CG/EM.....	24
5.4 Validação de Metodologia de Determinação de Teor Ácido Acético em Vinagre de Maçã por CLAE-DAD.....	27
5.5 Tratamento de resíduos.....	29

6. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	30
6.1 Adaptação de Metodologia para Análise de Benzo(a)pireno em Aroma de Fumaça por CG/EM.....	30
6.1.1 Tempo de análise e custo financeiro.....	30
6.1.2 Cromatogramas.....	31
6.1.3 Precisão e exatidão dos resultados.....	34
6.2 Validação de Metodologia de Determinação de Teor Ácido Acético em Vinagre de Maçã por CLAE-DAD	35
6.2.1 Determinação de parâmetros analíticos.....	35
7.CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	38
8. CONTRIBUIÇÃO DO ESTÁGIO À FORMAÇÃO PROFISSIONAL.....	39
9. REFERÊNCIAS.....	40
10. ANEXOS.....	44

TABELAS

Tabela 1 - Condições cromatográficas em CG/EM.....	28
Tabela 2 - Condições cromatográficas em CLAE-DAD.....	29
Tabela 3 - Comparação de tempo de análise e custo de solventes pelas diferentes metodologias.....	31
Tabela 4 - Resultados de BaP pelas diferentes metodologias.....	35
Tabela 5 - Resultados de amostras de vinagre de maçã.....	37

FIGURAS

Figura 1 - Vista aérea da empresa.....	12
Figura 2 - Exemplo de cromatograma.....	16
Figura 3 - Cromatograma de picos sobrepostos.....	17
Figura 4 - Estrutura de HPAs.....	19
Figura 5 - Cromatogramas sobrepostos das metodologias 1, 2 e 3.....	33
Figura 6 - Cromatograma de ácido acético.....	36
Figura 7 - Curva de calibração de ácido acético.....	37

ESQUEMAS

Esquema 1 - Funcionamento de um CG.....	14
Esquema 2 - Funcionamento de um CLAE.....	15

EQUAÇÕES

Equação 1 - Desvio Padrão.....	23
Equação 2 - Desvio Padrão Agrupado.....	23
Equação 3 - Desvio Padrão Agrupado para n=2.....	23
Equação 4 - Desvio Padrão Relativo Agrupado.....	23
Equação 5 - Limite de Detecção.....	38
Equação 6 - Limite de Quantificação.....	38

SIGLAS E ABREVIATURAS

Água UP: Água Ultra Pura

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BaP: Benzo(a)pireno

CR: Comissão de Regulamentos

FE e FM: Fase Estacionária e Fase Móvel

DIC: Detector por Ionização de Chama

CG-EM: Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa

HPA: Hidrocarbonetos Poliaromáticos

CLAE-DAD: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado a Detector por Arranjo de Diodos

INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

LD: Limite de Detecção

LQ: Limite de Quantificação

OMS: Organização Mundial da Saúde

PVDF: Fluoreto de polivinilideno

UV: Ultra Violeta

RESUMO

Neste trabalho foi adaptada uma metodologia para análise de Benzo(a)pireno (BaP) por cromatografia a gás acoplada à espectrômetro de massas (CG/EM) de forma a aumentar a eficiência e praticidade em laboratório. A implementação da metodologia adaptada reduz o consumo de solventes, tempo e mão de obra técnica no Laboratório de Cromatografia Gasosa (CRO) para determinação de BaP. Também foi validada a metodologia de análise de teor de ácido acético em vinagre de maçã por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD). A validação da metodologia foi realizada em acordo com portarias e guias da ANVISA e INMETRO para garantia de qualidade, rastreabilidade e segurança aos produtos analisados no Laboratório de Cromatografia Líquida (CRL).

Palavras-chaves: Benzo(a)pireno, ácidos orgânicos, CLAE-DAD, CG/EM

1. JUSTIFICATIVA

O presente trabalho foi desenvolvido ao longo das 540 horas exigido pela disciplina Estágio Supervisionado (QMC 5515), para conclusão do curso de Química Tecnológica da Universidade Federal de Santa Catarina. O estágio foi realizado no Laboratório de Cromatografia Líquida (CRL) e Laboratório de Cromatografia Gasosa (CRO) na empresa Duas Rodas Industrial Ltda, em Jaraguá do Sul.

Metodologias cromatográficas exigem investimentos milionários por parte da empresa para aquisição e manutenção dos equipamentos, semanas de treinamento e meses de prática para capacitação de um profissional na área, ainda assim, é um equipamento indispensável para indústrias alimentícias e farmacêuticas, com aplicações em múltiplas áreas, desde a garantia de qualidade ao desenvolvimento de produtos, tendo sido uma oportunidade única para meu desenvolvimento profissional, acadêmico e pessoal.

Os projetos foram idealizados pelas analistas e coordenadores do setor de Garantia de Qualidade devido às necessidades encontradas ao se analisar teor de Benzo(a)pireno (BaP) em aromas de fumaça por Cromatografia a Gás acoplada à Espectrômetro de Massas (CG/EM), assim como validar a metodologia para determinação do teor de ácido acético em vinagre de maçã por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD).

A análise atual de benzo(a)pireno em aromas de fumaça utilizada na empresa exige tempo e um complexo preparo de amostra, sendo ele uma atividade manual e demorada, logo foi adaptada uma metodologia para acelerar, simplificar e reduzir custos da análise de benzo(a)pireno. Para tal, foram consultados artigos da literatura sobre metodologia de detecção de HPA por CG/EM.

O ácido acético presente em vinagres contempla benefícios à saúde e é essencial para o aroma e sabor do produto final, sua análise varia conforme o tipo de vinagre (vinho, maçã, arroz) e matriz (em pó, mosto, líquido). Atualmente, na Empresa existe uma metodologia empregada para análise de ácido acético em vinagre de vinho por CLAE-DAD, no entanto é preciso validá-la para aplicação em vinagre de maçã para garantir a segurança, rastreabilidade e qualidade do produto conforme portarias estabelecidas pelo INMETRO e ANVISA.

2. APRESENTAÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO

A empresa Duas Rodas (Figura 1) é pioneira na extração de óleos essenciais, fundada em 1925 por Hildegard e Rudolph Hufenüssler. Atualmente, conta com mais de 2 mil colaboradores presentes em toda a América Latina, com 3 sedes no Brasil (Jaraguá do Sul, São Paulo e Sergipe) e 4 sedes fora do Brasil (Argentina, Chile, Colômbia e México). Possui sete unidades de produção, sete centros de pesquisa aplicada e o Innovation Center, atendendo mais de 10 mil clientes com seu portfólio de mais de 3 mil ingredientes, atendendo principalmente a Indústria de Alimentos e Bebidas¹.

A matriz da empresa é a unidade em Jaraguá do Sul, onde mais de mil colaboradores trabalham em 3 turnos, mantendo a fábrica sempre funcionando. Dentre o leque de produtos vendido a linha de sorvetina “Selecta”, um pó para fabricação de sorvetes, deu destaque a empresa que hoje é líder nacional na fabricação de produtos para sorvetes.

Para garantir a qualidade de seus produtos, a empresa faz análises para diferentes fins. São recorrentes análises para assegurar a qualidade da matéria prima dos fornecedores, investigar produtos da empresa extraídos no meio ou no fim do processo de produção e analisar amostras de produtos em desenvolvimento.

Figura 1- Vista aérea da empresa Duas Rodas, Ltda., em Jaraguá do Sul.



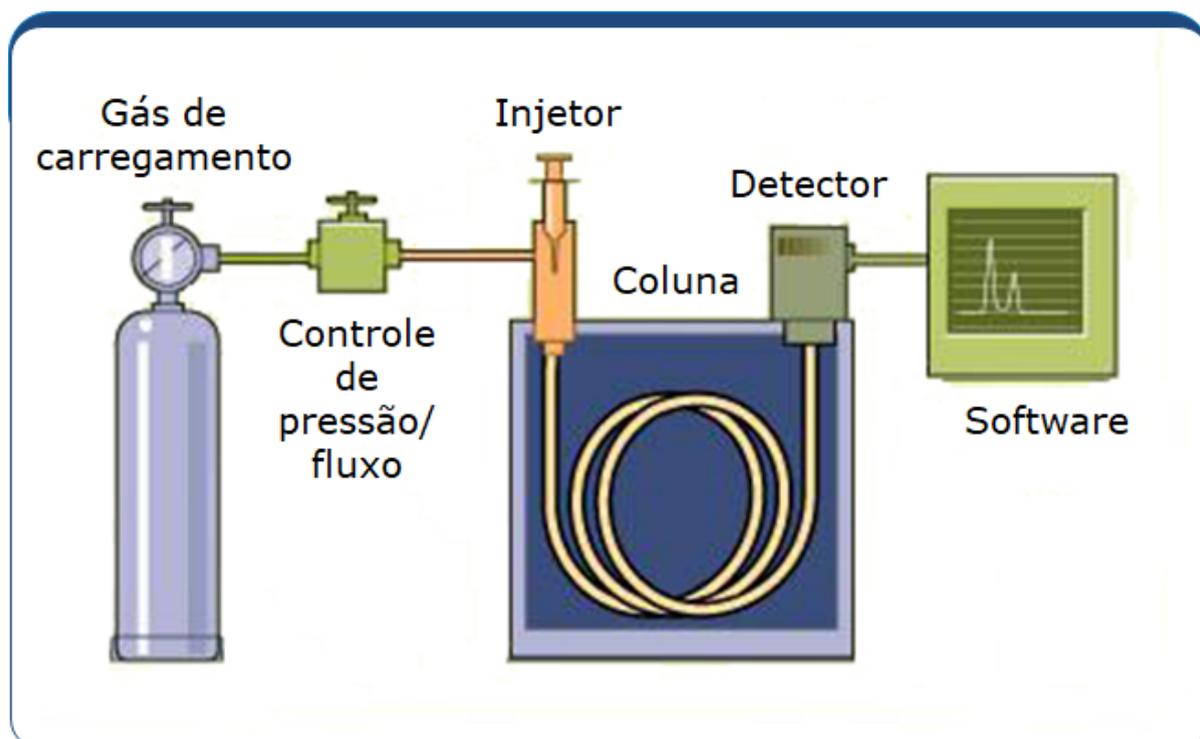
Fonte: OCP NEWS, 2020²

3. REVISÃO DA LITERATURA REFERENTE AO TRABALHO DESENVOLVIDO

3.1 Introdução à cromatografia

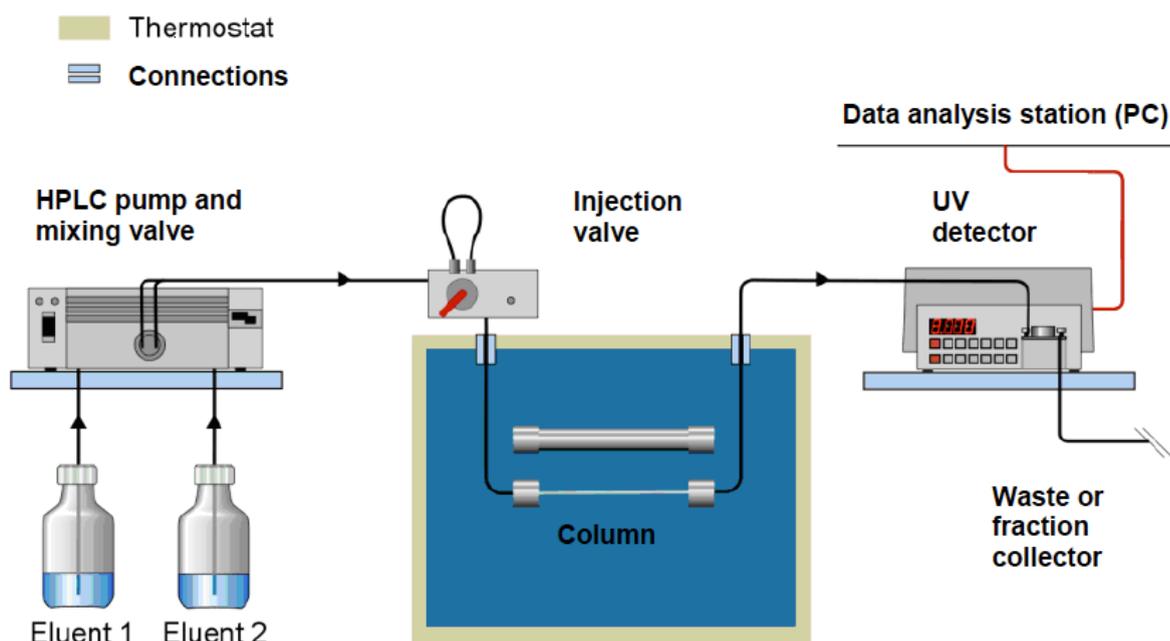
A cromatografia é um processo de separação e identificação dos componentes em uma amostra. A amostra devidamente preparada é inserida no início da coluna cromatográfica, que é recheada pela Fase Estacionária (FE), e será carregada pela Fase Móvel (FM). A separação dos componentes da amostra ocorre devido a adsorção dos mesmos pela FE, enquanto a FM elui em direção ao fim da coluna, devido à diferença de afinidade entre os componentes, a FE e a FM, os componentes chegam ao fim da coluna em tempos diferentes, esse processo é conhecido como corrida cromatográfica. O tempo de um componente para chegar ao fim da coluna é chamado de Tempo de Retenção (T_R) e em análises realizadas de forma ideal, o T_R de cada componente deve ser distinto dos outros³.

O devido preparo de uma amostra para análises cromatográficas depende das condições cromatográficas empregadas, matriz da amostra e componentes de interesse. As características da coluna, FE e FM classificam o tipo de cromatografia, como a cromatografia a gás (CG). Na CG temos a inserção da amostra pelo sistema de injeção, um gás de arraste (a FM) elui a amostra ao longo da coluna cromatográfica (FE), ao longo deste processo os componentes da amostra serão separados até a chegada de cada um ao detector, que produzirá um sinal elétrico para a leitura por meio eletrônico, criando assim o cromatograma. A coluna e o é mantida dentro de um forno do qual pode passar de 300 °C durante a análise e de 350 °C para limpeza do equipamento. A temperatura do forno e o ritmo de aquecimento são característicos de cada análise cromatográfica. O esquema 1 ilustra o funcionamento de um CG:

Esquema 1: Funcionamento de um CG

Fonte: DCTech³

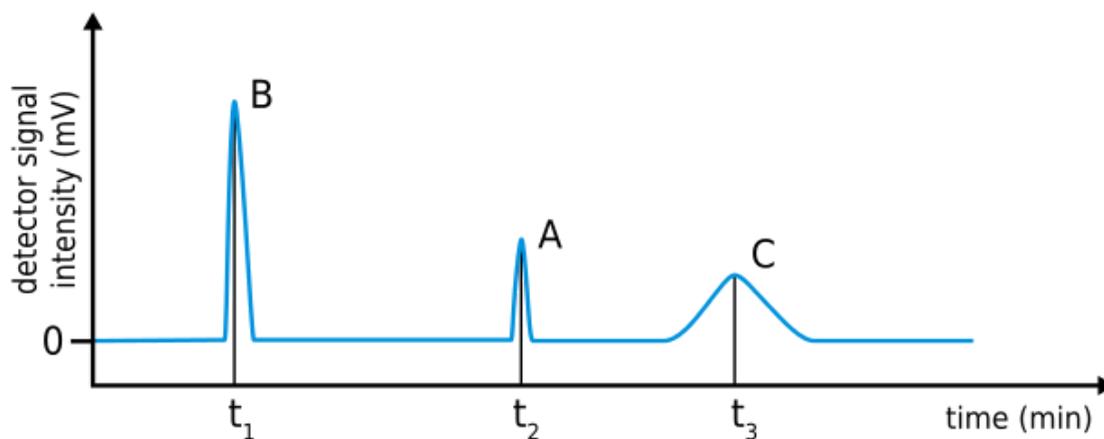
Outro exemplo de metodologia cromatográfica amplamente utilizada é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O CLAE tem a amostra introduzida no injetor, qual será eluída por uma ou mais soluções (FM) ao longo de uma coluna cromatográfica recheada (FE), esta coluna pode ser trocado por colunas mais curtas ou mais longas, de diferentes recheios, sendo cada característica de coluna apropriada para separação dos componentes. As pressões no interior da coluna são superiores a 600 bar para a análise. A temperatura da coluna pode ser controlada, no entanto não se emprega um forno exclusivo para esta metodologia como na CG. Ao fim da corrida cromatográfica, um detector analisa os componentes separados e emite um sinal elétrico para tratamento de dados e leitura em um sistema eletrônico⁴. A aplicação de pré-colunas e módulos pós-coluna para retenção de impurezas é aplicado em razão das matrizes utilizadas e preparo de amostra. O Esquema 2 ilustra o funcionamento de um CLAE.

Esquema 2: Funcionamento de um CLAE.

Fonte: DCTech⁵

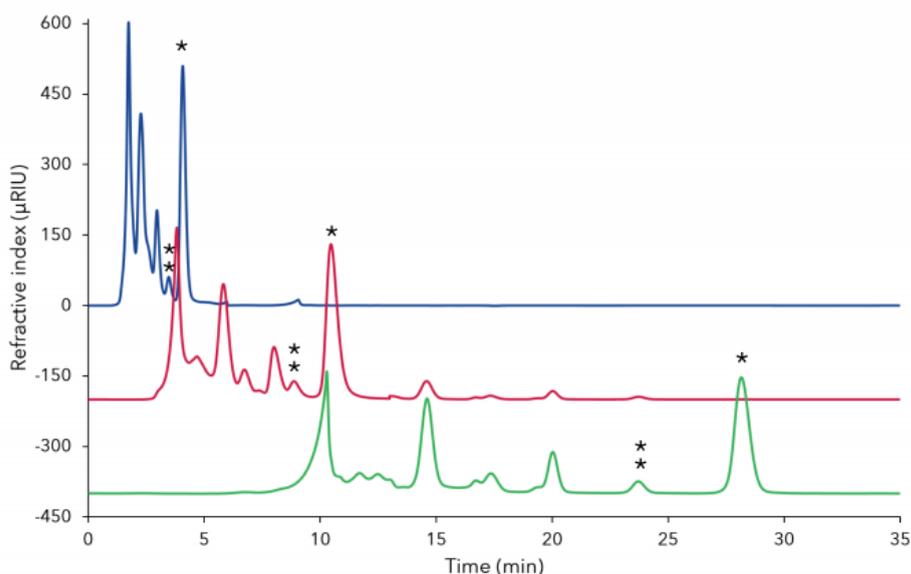
A fim de melhorar as condições cromatográficas para análise de diferentes substâncias, características cromatográficas como pressão e direção de fluxo na coluna podem ser alteradas.

Os detectores ao fim da corrida cromatográfica possibilitam a determinação e quantificação dos componentes individuais da amostra. A leitura do detector gera um cromatograma, onde cada composto possui um pico cromatográfico conforme exemplo de cromatograma na Figura 2.

Figura 2: Exemplo de cromatograma.

Fonte: Heliagon⁶

Onde A, B e C são picos cromatográficos de diferentes componentes de uma amostra e t_1 , t_2 e t_3 são os diferentes t_R de cada componente. Fica clara a característica de definição de um pico cromatográfico, onde um pico com base mais fina (A e B) é considerada mais definida, enquanto que um pico com base larga (C) é considerado menos definido. A definição do pico tem papel importante nas análises cromatográficas, pois idealmente a área de cada pico deve indicar a presença e quantidade de somente um composto, um pico menos definido aumenta as chances de sobreposição como indicado no cromatograma em azul apresentado no cromatograma de picos sobrepostos na Figura 3.

Figura 3: Cromatograma de picos sobrepostos.

Fonte: DCTech⁷

O cromatograma azul é pouco legível até mesmo com a aplicação de softwares para determinação de área, pois há baixa segurança ao determinar qual área corresponde a cada pico. Para solucionar isso, cada tipo de cromatografia possui uma solução, por exemplo, para o CLAE, alterar a coluna para uma de comprimento maior aumenta o tempo entre cada pico, utilizar soluções de solvente orgânicos em maiores concentrações para FM, aumenta a definição de cada pico, alterar as soluções utilizadas na FM pode trazer um cromatograma completamente diferente. Para um CG, alterar a temperatura do forno aumenta a definição de cada pico e alterar de injeção da amostra pode alterar completamente o cromatograma⁷.

Existe uma grande gama de detectores para múltiplas aplicações quantitativas e qualitativas, no entanto para cada metodologia cromatográfica, abaixo seguem alguns dos mais utilizados.

O Detector por ionização de chama (DIC) analisa os íons emitidos por uma amostra gasosa após a mesma incidir sobre o bocal de chama do equipamento. O sinal produzido por estes íons é amplificado, gerando um corrente, e lido pelo detector. Este método é destrutivo para a amostra, no entanto produz um resultado quantificável através dos métodos de normalização, padronização interna, método de adições e padronização externa. A quantificação por método de adição compara

a área do pico do composto de interesse com a área do pico de uma curva de calibração previamente introduzida no equipamento.

A espectrometria de massas (EM) consiste em uma fonte de ionização para transformar as moléculas da amostra incidente nos íons que a compõem. As fontes ionizadoras mais utilizadas são a ionização por elétrons e a ionização química por não fragmentarem tão intensamente as moléculas quanto às outras fontes. Para detectar os íons gerados, o equipamento altera o campo eletromagnético no interior do equipamento por um analisador quadrupolar, separando os íons formados em suas respectivas razões massa/carga, quais serão detectadas no fim do equipamento por um multiplicador de elétrons, que transforma o sinal iônico incidente em corrente elétrica legível para a formação de um gráfico⁸.

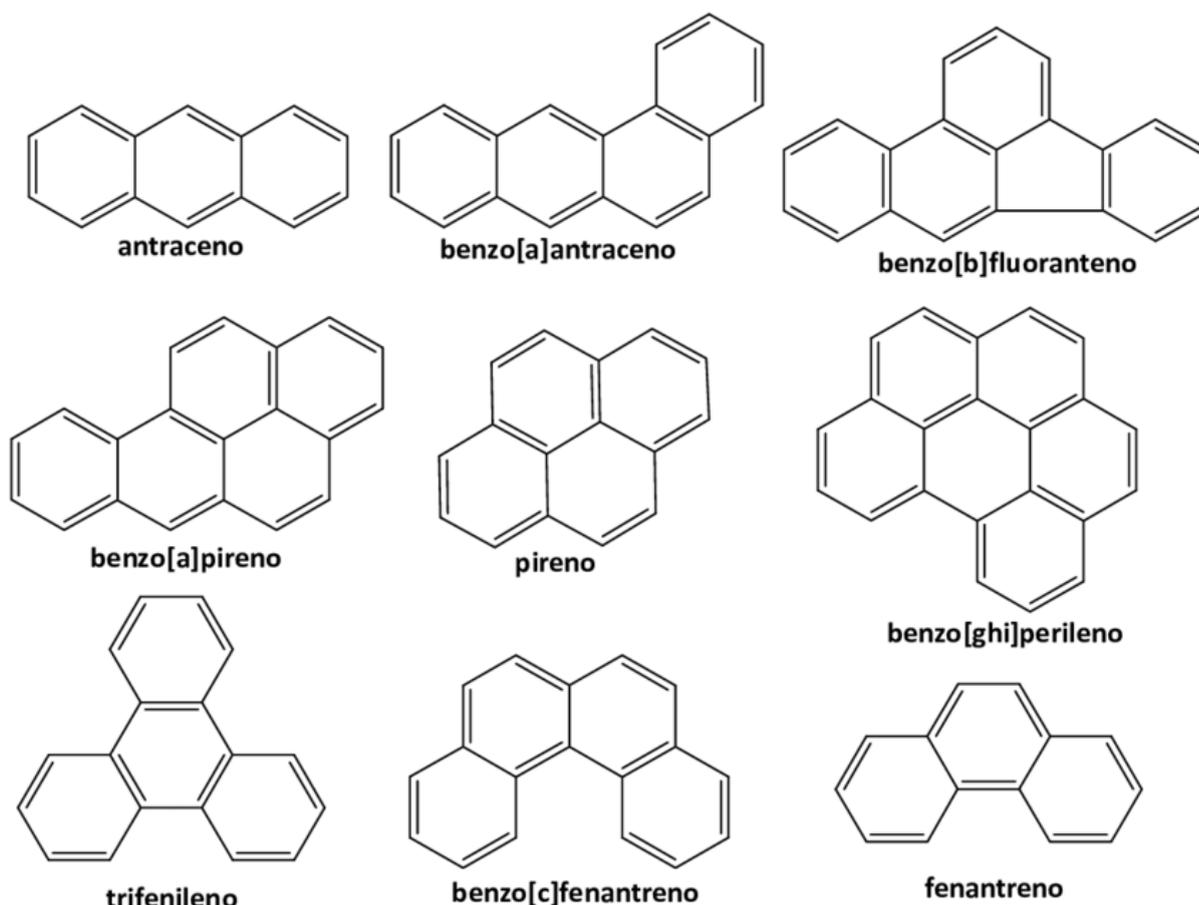
O Detector por Arranjo de Diodos (DAD) é um método espectrofotométrico que consiste em uma fonte de radiação na região do ultravioleta (UV), e outra na região do visível, abrangendo comprimentos de onda de 260 a 750 nm. Amostras podem ser analisadas pela forma como elas absorvem e emitem essa radiação, produzindo um espectro característico de absorção/emissão. A vantagem de utilizar o DAD está na leitura de múltiplos comprimentos de onda de cada componente e selecionar o melhor comprimento de onda para quantificação dos componentes.

3.2. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos e Benzo(A)Pireno na alimentação humana

A humanidade emprega a cocção de alimentos por defumação a milhares de anos, com objetivo de preservar o alimento e alterar suas propriedades sensoriais, porém os processos de defumação de alimentos cresceram à larga escala somente nos anos 1970, utilizando os mesmos métodos de oxidação de diferentes espécies de madeira para obter a fumaça qual proporcionará as características desejadas⁹. Mesmo seguindo todas as normas de segurança e higiene da indústria alimentícia, essa forma de cocção ainda possui substâncias tóxicas e carcinogênicas produzidas na fumaça que inevitavelmente são transferidas ao alimento, dentre eles os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) compõe a família mais conhecida e tóxica.

Os HPA são uma família de mais de 100 compostos orgânicos formados por 2 ou mais anéis aromáticos, constituídos somente de carbono e hidrogênio conforme as estruturas de HPAs comuns apresentadas na Figura 4. Mesmo em baixas concentrações, estes compostos já foram provados como causadores de câncer em seres humanos¹⁰⁻¹² e sua concentração em alimentos depende da forma de cocção empregada, natureza do alimento e teor de gordura¹³. A forma qual estamos mais suscetíveis à exposição de HPA é através de alimentos defumados e grelhados, e para sua detecção, analisamos o teor de Benzo(a)pireno (BaP) qual é um marcador substituto para determinar a presença de outros HPA, ou seja, a presença de BaP está correlacionada com a presença de outros HPA¹⁴. A estrutura molecular do BaP também está presente na Figura 4.

Figura 4: Estrutura de HPAs



Fonte: NETO, J. O.¹⁵

Em 2015, a Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou carnes processadas como grupo 1 de carcinogênicos, assim como tabaco e amianto¹⁶. De forma a amenizar os efeitos nocivos do consumo de embutidos enquanto preservando as qualidades defumadas de alimentos, são adicionados aromas naturais de fumaça, pois a matriz pode ser facilmente analisada e controlar mais facilmente a qualidade do produto final. A ANVISA qualifica o aroma de fumaça como a água produzida do arraste a vapor do processo de pirólise de madeiras duras ou o destilado do líquido produzido na queima¹⁷. A Comissão de Regulamentos (CR) da Autoridade de Segurança Alimentar Europeia (EFSA) limita a concentração máxima de BaP em 6 µg por Kg de alguns alimentos, enquanto que no Brasil, a legislação determina que a concentração de BaP nos aromatizantes/aromas de fumaça não pode superar 0,03 µg por Kg de alimento final e 0,7µg de benzo(a)pireno por L de águas potáveis, implicando que não há uma concentração máxima de BaP em aromas de fumaça legislada¹⁸⁻²⁰. Diante disso, o controle do teor de benzopirenos e outros hidrocarbonetos como benzofluorotenos, benzoantracenos e benzofluorenos se tornou essencial para manter a saúde do consumidor^{17, 18, 20}.

A metodologia para determinação de BaP usada atualmente na empresa exige um excesso de solventes orgânicos e consome tempo útil do técnico. Por isso, foi adaptada uma metodologia mais ágil e com menor gasto de solventes para determinação de BaP por CG/EM.

3.3. Vinagre, teor de Ácido Acético e suas utilidades

O vinagre é um condimento utilizado com objetivo de adicionar componentes ácidos e amargos aos alimentos, assim como preservar carnes e vegetais quando imersas na solução. Sua produção é praticada pela humanidade a milhares de anos, tendo sido explorada de diferentes matérias primas ao longo dos séculos e localidades refletindo a produção local. No Brasil, o vinagre mais comum e consumido são os vinagres de álcool (80%), extraído da cana, e de vinho²¹.

Menos de 3% do vinagre produzido no Brasil é de maçã, no entanto, ele confere características ácida, cítrica e doce ao alimento, assim como alta concentração de vitaminas, antioxidantes e ácidos orgânicos que ajudam na absorção de cálcio, regulação da glicose sanguínea, controle de pressão arterial e incentivo de apetite^{21, 22}. Todas essas propriedades são interessantes para indústrias alimentícias, farmacêuticas e para exportação de seus produtos.

Vinagres são produzidos atualmente através de dois processos bioquímicos, a fermentação alcoólica, executada por uma levedura do gênero *Saccharomyces*, e a fermentação acética, executada por uma bactéria do gênero *Acetobacter*²³. O ácido acético, componente mais importante do vinagre, provém da oxidação do álcool no processo de acetificação pelas bactérias durante a fermentação acética. Devido a isso, vinagres sempre contém álcool dentro de um limite tolerável, caso contrário às bactérias podem degradar o ácido acético produzido com prejuízo para o produto final. A legislação brasileira estabelece em 1,0% v/v o teor alcoólico máximo para o vinagre²¹.

Para garantir a qualidade do produto e de sua produção, foi validada a metodologia de determinação de teor de ácido acético em vinagre de maçã por CLAE-DAD.

3.4. Validação de metodologia e parâmetros para validação

A validação de metodologias por órgãos governamentais é uma forma de garantir imparcialidade e eficiência na aplicação de metodologias analíticas a fim de garantir qualidade, rastreabilidade e segurança aos clientes, empresas, fornecedores e colaboradores. Para cada produto no mercado, alguma metodologia

é aplicada de forma a assegurar ao consumidor final e empresas de que este é idêntico a todos os outros de mesma marca e fabricante, seguro dentro de sua aplicação e confiável²⁴. Para a exportação de mercadorias, selos de qualidade são imprescindíveis no mercado exterior, sendo uma forma imparcial e universal de qualidade e segurança para consumidores e empresas independente de cultura e padrões de qualidade em todo o mundo²⁵. Para obtenção de selos, é necessária a validação das metodologias analíticas de acordo com órgãos internacionais e inspeções por agentes independentes.

Para validação de metodologia cromatográfica, foi utilizada a revisão dos guias da ANVISA e INMETRO^{16, 26}. De acordo com a literatura, a determinação dos seguintes parâmetros para validação são essenciais:

- Seletividade garante que a resposta seja exclusivamente do analito de interesse;
- Linearidade e faixa de aplicação estabelece a região onde a resposta do detector é proporcional à concentração da substância na amostra;
- Precisão é a dispersão dos resultados independente da média e é dada pelo desvio padrão e o coeficiente de variação;
- Exatidão é a concordância dos resultados obtidos com um resultado informado como real;
- Limite de detecção e Limite de quantificação são respectivamente, os limites mínimos de concentração detectados e quantificados pelo equipamento;
- Robustez é o parâmetro que mede a variação de resultados do equipamento após uma pequena variação deliberada.

Além destas características, foi determinado também o desvio padrão agrupado e o coeficiente de variação agrupado. Esses parâmetros são indicados para quando um grande número de análises similares (todas as amostras são vinagre de maçã de concentração de ácido acético similar), porém baixo número de repetição de cada amostra (análises realizadas em duplicata, ou de 3 a 5 vezes)²⁷. O desvio padrão agrupado, utiliza os resultados de múltiplas amostras analisadas com um baixo número de repetições, nesse caso, ao invés de se encontrar uma média de

todos os resultados e comparar cada resultado com a média, se determina a média de cada amostra, e o desvio padrão de cada amostra. Com o desvio padrão de cada amostra, obtemos o desvio padrão agrupado. A diferença entre fórmulas está presente abaixo.

Equação 1: Desvio Padrão

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Equação 2: Desvio Padrão Agrupado

$$s_p = \sqrt{\frac{(n_1-1)s_{2,1}^2 + (n_2-1)s_{2,2}^2 + \dots + (n_k-1)s_{n,k}^2}{n_1+n_2+\dots+n_k-k}}$$

Para um desvio padrão agrupado realizado em duplicata temos a diferença de cada resultado individual e sua média sendo levada em consideração, conforme:

Equação 3: Desvio padrão agrupado para n=2

$$s_p = \sqrt{\frac{\sum(x_{ij} - \bar{x}_j)^2}{n-1}}$$

Os resultados de desvio padrão podem ser agrupados para determinar o desvio padrão relativo agrupado, da seguinte forma:

Equação 4: Desvio padrão relativo agrupado

$$s_{r,p} = \sqrt{\frac{\sum(n_i-1)s_{r,i}^2}{\sum(n_i-1)}}$$

O valor percentual do desvio padrão relativo agrupado é o coeficiente de variação. Com os valores agrupados é possível determinar os parâmetros analíticos com um grande grupo amostral realizado com baixas repetições.

4.OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Este trabalho visa adaptar uma metodologia para determinação de Benzo(a)pireno (BaP) por CG/EM de acordo com as necessidades estabelecidas pela empresa, e validar a metodologia de determinação de ácido acético em vinagre de maçã por CLAE-DAD de acordo com as agências reguladoras.

4.2 Objetivos específicos

4.2.1 Adaptação de Metodologia para Análise de Benzo(a)pireno em Aroma de Fumaça por CG/EM

Realizar levantamento bibliográfico sobre os métodos de determinação de Análise de Benzo(a)pireno em Aroma de Fumaça por CG/EM;

Adaptar a metodologia atualmente empregada à metodologia selecionada da literatura;

Determinar a exatidão das metodologias usadas atualmente e a proposta nesse trabalho, assim como comparar os custos e o tempo em cada análise.

4.2.2 Validação de Metodologia de Determinação de Teor ácido acético em Vinagre de Maçã por CLAE-DAD

Realizar a análise de amostras de lotes de vinagre de maçã produzidos na empresa enviados para análise externa e comparar os resultados;

Levantar um grupo significativo de resultados de análises de amostras de mesmo material, porém de diferentes lotes fabricados e analisados neste ano pela empresa, para determinação de ácido acético em vinagre de maçã;

Determinar os parâmetros de seletividade, linearidade, faixa de aplicação, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez para validação de uma metodologia cromatográfica de acordo com a ANVISA e INMETRO^{16, 26};

5.METODOLOGIA

5.1 Reagentes

Ciclohexano CLAE, diclorometano PA, n-hexano CLAE, metanol PA e 1-Propanol PA, foram fornecidos pela Merck, assim como o padrão analítico de BaP. A água ultrapura utilizada foi obtida no laboratório em sistema Milli-Q. O hélio utilizado na FM do CG e o nitrogênio foram fornecidos pela White Martins. Todas as soluções para FM foram desgasificadas em banho ultrassônico antes do uso. As amostras de aroma de fumaça foram extraídas do mesmo lote produzido em março de 2021 e as amostras de vinagre de maçã foram extraídas de lotes produzidos ao longo de 2021. A Solução de 1-propanol é composto de 15% de de 1-Propanol e 85% água e é produzida no laboratório. O sulfato de sódio e hidróxido de potássio foi adquirido da Synth.

5.2 Equipamentos

Os Cartuchos Bond-Elut Plexa 200 mg (part number 12109610) foram fornecidos pela Agilent e os filtros de Fluoreto de polivinilideno (PVDF) Whatman Uniflo 0,22 µm foram fornecidos pela Sigma Aldrich. Foi usado o sistema Milli-Q modelo IQ 7005 da Sigma Aldrich. Para banho ultrassônico foi usado Banho de Ultrassom modelo SSBU 3,8L Bivolt fornecido pela 7Lab. Para a análise de BaP foi utilizado um cromatógrafo a gás modelo 7820A da Agilent com espectrômetro de massa modelo 5977B e coluna HP-5MS ultra inert, 30 m x 250 µm x 0,25 µm e um CLAE modelo 1260 Infinity II com coluna Polaris 5 C-18 250x4,6 mm da Agilent para análise de ácido acético.

5.3 Adaptação de Metodologia para Análise de Benzo(a)pireno em Aroma de Fumaça por CG/EM

A metodologia empregada atualmente na Empresa começa com a solubilização de 0,5 g de amostra de aroma de fumaça em 10,0 g de Solução de 1-propanol, filtração em papel filtro e Clean Up.

Para a etapa de Clean Up, foi ativado um cartucho chromabond C18 de 3 mL com 12 mL de Solução de 1-propanol (uma seringa de plástico foi utilizada para realizar a pressão necessário para que a solução atravessasse o cartucho), em seguida o cartucho foi limpo com 12 mL de água ultrapura (UP) sem deixar que ele seque. A amostra foi inserida no cartucho e eluída com 4 mL de Solução de 1-propanol, realizando pressão com a seringa até o cartucho secar. O cartucho foi limpo com 2 mL de diclorometano e a amostra foi recolhida em frasco de 2 mL. Sulfato de sódio foi aplicado em agitação até a transparência da solução, indicando absorção da água e a amostra foi recolhida com o auxílio de uma pipeta de Pasteur para outro frasco de 2 mL. Esta metodologia foi nomeada de Metodologia 1.

Para atender as demandas da Empresa foram consultadas metodologias da literatura para análise de BaP e outros HPA por cromatografia a gás²⁸⁻³¹. Devido à semelhança das metodologias, as etapas de preparo das amostras foram divididas em pré-Clean Up e Clean Up:

- Pré-Clean Up: Pesagem da amostra e diluição, saponificação, separação líquido-líquido.
- Clean Up: Múltiplas etapas de limpeza em coluna recheada, limpando a coluna com diferentes solventes orgânicos, aplicando a amostra e eluindo-a com solventes;

O artigo escolhido para ser replicado foi o de Simon²⁸, qual visa um preparo de amostra mais ágil, simples e barato enquanto mantendo a qualidade e segurança do processo^{32, 33}.

A metodologia de Simon foi nomeada de metodologia 2 e para reproduzi-la foi pesado cerca de 10 g de amostra de aroma de fumaça em balão de fundo redondo e aquecido a 90°C em refluxo com 3,2 g de hidróxido de potássio e 32 mL de metanol por 30 minutos. Feito isso, as fases foram separadas em funil de separação com três lavagens de 25 mL de ciclohexano e secagem da fase orgânica em filtro com sulfato de sódio. O filtrado foi deixado secar em capela sob vazão de gás nitrogênio até ebulição de todo o solvente, e foi adicionado 1 mL de ciclohexano ao produto final.

Para a etapa de Clean Up, a amostra foi inserida em um cartucho Chromabond e eluída com 7 mL de ciclohexano, seguida de evaporação do solvente

em capela com fluxo de gás nitrogênio. A amostra foi reconstituída com 1 mL de n-hexano e injetada no equipamento.

A metodologia de Simon reduz a etapa de Clean Up com a utilização de uma saponificação, no entanto outros autores discordam da necessidade desta etapa²⁸. Sabendo disso, uma nova metodologia baseada em Simon sem a etapa de saponificação foi adaptada com o interesse de reduzir gastos de solvente e tempo de preparo. Essa metodologia adaptada foi nomeada de metodologia 3. Foi pesada uma massa de 0,5 g de amostra de aroma de fumaça e diluída em 10,0 g de Solução de 1-propanol (1-propanol:água/15:85), a solução foi filtrada em papel filtro e o filtrado foi inserido em um cartucho Chromabond e eluído com 7 mL de ciclohexano. A amostra foi deixada secar sob vazão de nitrogênio, o restante foi reconstituído com 1 ml de n-hexano e injetado no equipamento.

As metodologias 1, 2 e 3 foram realizadas em triplicata. Uma curva de calibração de BaP de 5 pontos foi realizada e o equipamento foi calibrado antes das análises das metodologias. As condições cromatográficas utilizadas na metodologia de Simon são similares às utilizadas na metodologia atual no laboratório, por isso optou-se por manter as mesmas metodologias da metodologia atual. As condições cromatográficas utilizadas no equipamento seguem abaixo:

Tabela 1: Condições cromatográficas em CG/EM

Volume de injeção	1,5 µL
Temperatura do injetor	300 °C
Pressão	13,03 psi
Modo de injeção	Splitless Pulsado
Pressão do Pulso de injeção	35 psi até 0,5 min
Fluxo de purga	100 mL/min por 1 min
Economizador de gás	30 mL/min após 3 min
Rampa de aquecimento	55 °C por 1 min, 20 °C/min até 320 °C por 3 min
Coluna	HP-5MS ultra inert, 60 °C-325 °C(350 °C) 30 m x 250 µm x 0,25µm
Temperatura da linha referência	290 °C
Fase Móvel	Hélio
Fator de Ganho	3
Solvent Delay	13,00 min
Íon quantificador	252,00 m/z
Íon qualificador	250,00 m/z e 126,00 m/z

5.4 Validação de Metodologia de Determinação de Teor Ácido Acético em Vinagre de Maçã por CLAE-DAD

Para preparo da amostra foi pesado cerca de 0,1 g das amostra de vinagre de maçã em balão volumétrico de 100 mL, o volume do balão foi completado com água ultra pura e a solução foi filtrada com filtro de PVDF antes de ser injetada em vial de 2 mL para a análise. Uma curva de calibração de 5 pontos foi feita com ácido acético grau CLAE e o equipamento foi calibrado. Este procedimento validado para a análise de vinagre de vinho pela AOAC³⁴, as condições cromatográficas da metodologia utilizada seguem abaixo:

Tabela 2: Condições cromatográficas em CLAE

Coluna	C18 250mm x 4,6mm
Fluxo	0,8mL/min
Volume de injeção	5µL
Temperatura	não controlada
Tempo de análise	12 minutos
Fase móvel	Tampão - Na ₂ HPO ₄ (0,2 M)/H ₃ PO ₄ (pH 2,4)
Modo	Isocrático
Comprimento de Onda DAD	214 nm

Para a determinação dos parâmetros estatísticos, a seguinte estratégia foi tomada:

A seletividade foi determinada pela comparação dos resultados do DAD à um padrão de ácido acético, sendo considerada seletiva se o equipamento determinar com mais de 98,0% de precisão as bandas características da amostra comparadas ao padrão de calibração;

A linearidade e faixa de aplicação foram determinados pelos padrões de calibração utilizados e pela leitura da curva de calibração do equipamento, qual indica um coeficiente de correlação (R^2) a cada calibração;

Para determinar a precisão, foram reunidas 62 análises realizadas em quintuplicatas ao longo de 2021 com a metodologia a ser validada, determinando desvio padrão agrupado e coeficiente de variação agrupado;

Para a determinação de exatidão, foi enviada uma amostra para um laboratório independente. Esse resultado foi aceito como verdadeiro e duas amostras foram analisadas, uma era a amostra do lote que foi enviada ao laboratório independente, nomeada de amostra A, e a outra era a amostra de um lote contendo o mesmo valor de ácido acético. Ambas foram preparadas e analisadas de acordo com a metodologia a ser validada em quintuplicata.

Os limites de detecção e quantificação são obtidos a partir da precisão;

A robustez foi testada com uma variação de cerca de 0,1 unidade de pH.

5.5 Tratamento de resíduos

Os solventes orgânicos utilizados e soluções contendo solventes orgânicos foram descartados em bombonas de plástico para serem descartados em aterros especializados para solventes orgânicos, enquanto que soluções aquosas contendo amostras foram descartadas na pia, para serem tratadas na estação de tratamento de efluentes da empresa. Análises de qualidade de água foram realizadas diariamente no setor de Garantia de Qualidade e ao menos 3 vezes ao dia na estação para garantir que não houve impacto das soluções sobre a qualidade da água. A porção amostral não utilizada foi separada em amostras sem componentes tóxicos (como as amostras de vinagre de maçã), quais foram direcionadas à adubagem, enquanto que as amostras com componentes indesejados (como o aroma de fumaça) foram descartada para ser enterrada juntamente aos solventes orgânicos.

6. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NO ESTÁGIO

6.1 Adaptação de Metodologia para Análise de Benzo(a)pireno em Aroma de Fumaça por CG/EM

6.1.1 Tempo de análise e custo financeiro

As três metodologias diferem principalmente nos fatores de tempo de preparo de amostra e gasto de solventes. Os custos de solventes, reagentes e descarte foram informados pela gestão financeira da empresa. O custo de reagentes e solventes leva em consideração somente o custo dos produtos químicos utilizados no preparo de amostra, enquanto que o custo total adiciona o custo do descarte de R\$40 por litro de resíduo ao custo de reagentes e solventes. A fim de comparar mais facilmente a particularidade de cada uma, foi montada a tabela abaixo:

Tabela 3: Comparação de tempo de análise e custo de solventes pelas diferentes metodologias

Metodologia	Tempo por amostra	Volume de solventes e reagentes por amostra	Custo de reagentes e solventes por amostra	Custo total por amostra
1 (metodologia utilizada pela Duas Rodas)	40 minutos	26 g de Solução de 1-propanol, 2 mL de diclorometano	R\$ 2,1488	R\$ 3,2688
2 (Reprodução da metodologia de Simon)	65 minutos	32 mL de metanol, 83 mL de ciclohexano, 3,2 g de KOH, 1 mL de n-hexano	R\$25,5724	R\$30,2124
3 (Metodologia Adaptada)	5 minutos	10,0 g de Solução de 1-propanol, 8 mL de ciclohexano	R\$1,992	R\$2,672

A metodologia 1 emprega somente 2 mL de diclorometano e 26 g de solução trabalha, qual é composta somente de 15% de 1-propanol e 85% de água, porém, essa solução precisa ser descartada como resíduo orgânico, sendo aterrado com as bombonas de solventes orgânicos, logo, em termos de tratamento de resíduo, essa

porção é tratada como um solvente orgânico. O 1-propanol é pouco mais tóxico que o etanol, no entanto consideravelmente menos tóxico que o metanol, pequenas quantidades são produzidas no corpo humano tornando-o brandamente poluente, no entanto ele é mais pesado que o ar e é extremamente inflamável, assim como o solvente mais caro por litro comprado pela empresa³⁵. O diclorometano por outro lado é extremamente tóxico, sendo facilmente inalado e absorvido pela pele, causando enxaqueca, náusea, fraqueza e em casos mais severos perda de consciência, coma e morte³⁶. Além disso, o diclorometano é metabolizado no corpo lentamente em monóxido de carbono, o qual contempla um risco horas após a exposição³⁷.

A metodologia 2 possui o maior gasto de solventes, devido à etapa de saponificação, esta torna o preparo de amostra mais robusto, aumentando o leque de matrizes amostrais analisáveis por retirar interferentes, no entanto, a saponificação consome mais solvente, mais tempo da análise e obtém maior custo³². Outros autores não consideram esta etapa necessária para determinação e BaP³⁸. O metanol é altamente inflamável, causa cegueira com o consumo de menos de 10 mL e é potencialmente fatal com o consumo de menos de 30 mL, sendo recomendada uma exposição de no máximo 260 mg/m³³⁹. De acordo com a Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico da Braskem⁴⁰ o ciclohexano é inflamável e impõem riscos à saúde da vida marinha em baixas concentrações, sendo um risco para a saúde humana caso contamine reservatórios.

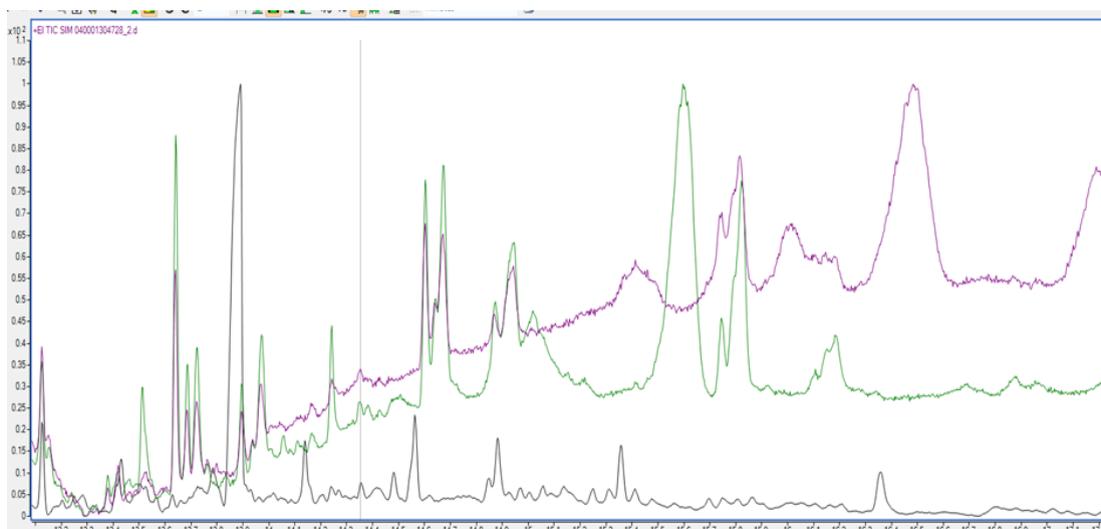
A metodologia 3 por outro lado, utilizou a menor quantidade de solventes e reagentes, produziu a menor quantidade de resíduos e consome o menor tempo para preparo de amostra. Em razão disto, a metodologia 3 se mostrou mais eficiente.

6.1.2 Cromatogramas

O cromatograma abaixo apresenta os resultados mais representativos das triplicatas das 3 metodologias empregadas, a reprodução do artigo de Simon (metodologia 2, em preto) apresentou a linha base mais estável, enquanto que a reprodução da metodologia utilizada pela Duas Rodas atualmente (metodologia 1,

em roxo) e a metodologia adaptada (metodologia 3, em verde) tiveram uma variação maior na linha base. O equipamento determinou que o pico em 14,34 min como BaP com uma segurança de 62% quando comparado à base de dados do equipamento. De acordo com outros trabalhos levantados²⁸⁻³¹ o T_R do BaP é de 14,3 min. A baixa segurança do equipamento em afirmar este pico como BaP provém da interferência do criseno (outro HPA) na amostra, qual possui uma razão carga massa do íon qualificador de 250,00 idêntico ao BaP, no entanto, de acordo com o banco de dados do equipamento, o criseno possui um sinal de massa carga de 128,00 maior que o sinal de 250,00 enquanto que o BaP, conforme acusado pela leitura do padrão, possui um sinal do íon 250,00 mais intenso. O pico em 14,34 min é o único pico onde isso foi observado. Baseado nisso, este pico foi considerado como o pico de BaP para determinação de concentração. Abaixo segue o cromatograma sobreposto das metodologias 1,2 e 3.

Figura 5: Cromatogramas sobrepostos das metodologias 1, 2 e 3



A alteração da linha base pode causar um desvio de precisão para determinação de concentração, assim como torna o processo de selecionar a área do pico um processo mais manual. Algumas hipóteses foram levantadas sobre a causa dessa variação:

O material da coluna, mesmo sendo estável à temperatura e inerte, ainda se deteriora com o tempo, expansão e contração térmica sendo carregado com a fase móvel. Isso causa uma elevação da linha base por mais matéria estar passando pelo

detector do que entrou (no caso siloxanos, o material da coluna). Este efeito é conhecido como “sangramento” da coluna⁴¹⁻⁴³;

O cromatógrafo utiliza um detector de condutividade térmica, o qual compara a condutividade térmica entre a linha contendo a amostra e uma linha contendo somente o gás eluente. Este detector mede a concentração do gás de arraste na linha. Grandes variações de temperatura pelo detector causam pequenas variações de vazão, causando um aumento na expulsão da linha ao longo do tempo, elevando a linha base⁴⁴;

Por fim, a adsorção de componentes de alto ponto de ebulição pela FE na coluna em análises anteriores, causa a elevação da linha base nas análises seguintes, pois a liberação desses componentes causa uma vazão de saída maior que a de entrada. Este fenômeno é conhecido como “contaminação”, e pode explicar desde a elevação de linha base, até o aparecimento de picos interferentes^{41, 42}.

As análises das metodologias 1 e 3 foram realizadas em sequência no mesmo dia, ou seja, a metodologia 1 foi realizada em triplicata e em seguida a triplicata da metodologia 3 foi analisada. No entanto, a metodologia 2 só pode ser analisada no dia seguinte. A variação de linha base entre cada repetição de metodologia foi imperceptível, diferentemente da variação entre análises. Todas as metodologias foram testadas e após o procedimento de limpeza do equipamento, que dura 1 hora a 350 °C. Conforme dito anteriormente, a robustez da etapa de saponificação na metodologia 2 expande o leque de substâncias analisáveis por retirar interferentes da amostra, uma possível causa da alteração de linha base pode ser a presença de tais interferentes.

O equipamento encontra silanos nas moléculas com altos T_R nas amostras preparadas pelas 3 metodologias, mesmo que a linha base se altere somente na metodologia 1 e 3. As condições cromatográficas para todas as análises foram as mesmas em todas as metodologias, por isso foi desconsiderada a possibilidade de sangramento da coluna.

De acordo com Simon, a necessidade de uma etapa de saponificação era inconclusiva na literatura, pelo fato das diferentes matrizes amostrais acumularem BaP em diferentes concentrações e à presença de compostos interferentes de tempo de retenção similar ao BaP. A presença de HPA é testada em alimentos

cárneos e óleos, ambos ricos em gorduras que solubilizam os HPA. O aroma de fumaça é composto majoritariamente por água, que pode ser separada dos HPA mais facilmente. Por causa disto, Simon atribui a estabilização da linha base à etapa de saponificação.

6.1.3 Precisão e exatidão dos resultados

Para a determinação de precisão e exatidão das metodologias, foi determinada a concentração de BaP nas amostras através da razão das áreas dos picos. Estes estavam todos dentro da curva de calibração aplicada. A curva de calibração obteve um R^2 de 0,99999. Segue na tabela abaixo os resultados de BaP pelas diferentes metodologias:

Tabela 4: Resultados de BaP pelas diferentes metodologias

Metodologia	Média (mL/Kg) ⁻¹	Desvio Padrão (mL/Kg) ⁻¹	Coefficiente de Variação
1	9,8291	0,1923	1,96%
2	0,3026	0,0016	0,52%
3	9,6369	0,1867	1,94%

Os resultados da metodologia 2, a reprodução do artigo de Simon, contém um baixo teor de BaP devido aos longos processos de secagem do volume de solvente, causando uma diminuição na concentração de BaP presente na amostra.

Os resultados das metodologias 1, metodologia da AOAC atualmente utilizada pelo laboratório, e metodologia 3, a metodologia adaptada de Simon à metodologia usada atualmente, possuem um valor de desvio padrão relativo aceitável para determinação de contaminantes (entre 1 e 2%)²⁶.

A partir dos parâmetros mensurados, as metodologias 1 e 3 foram consideradas as mais confiáveis, enquanto que a metodologia 3 contém mais

ganhos em termos de tempo e economia total de solventes, a metodologia 1 utiliza solventes mais brandos ao ambiente.

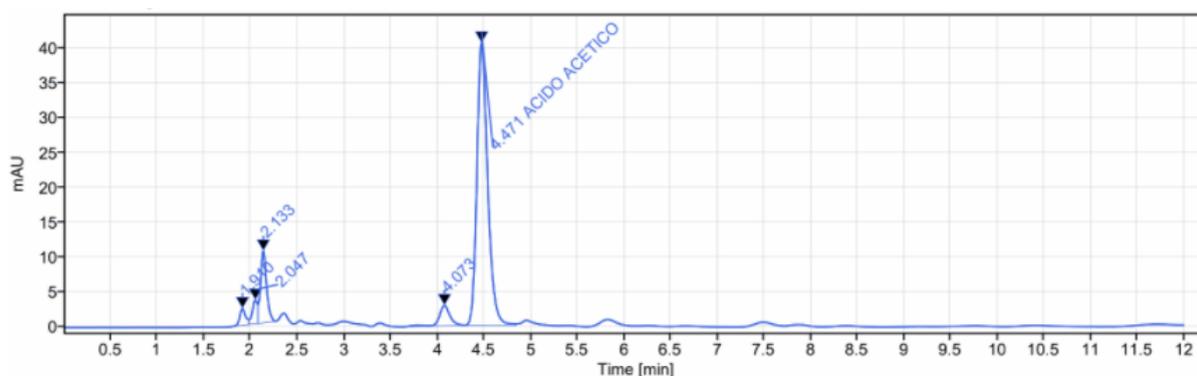
6.2 Validação de Metodologia de Determinação de Teor Ácido Acético em Vinagre de Maçã por CLAE-DAD

6.2.1 Determinação de parâmetros analíticos

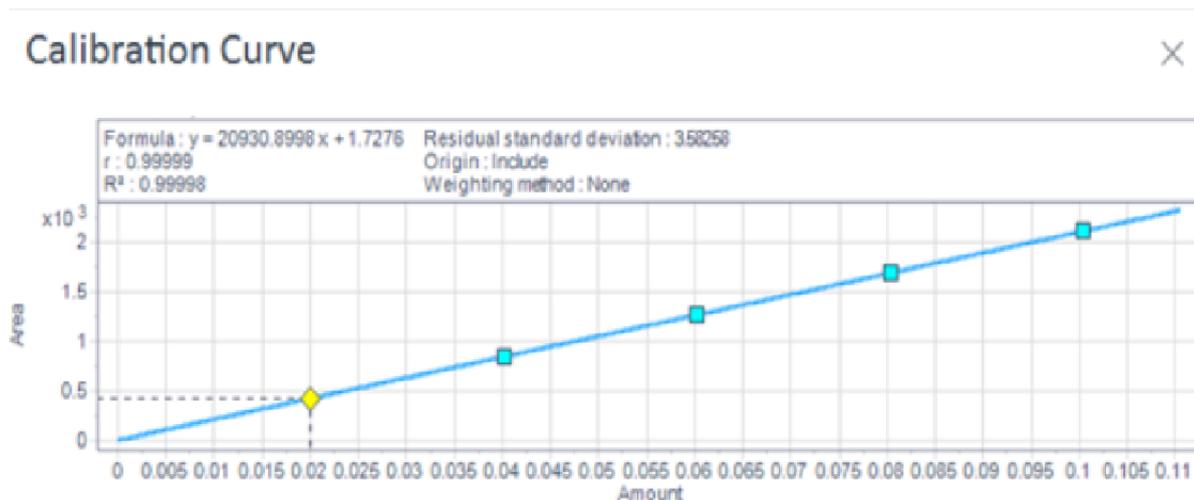
Para a validação da metodologia por CLAE-DAD para determinação do teor de ácido acético em vinagre de maçã, duas amostras de ácido acético foram selecionadas, nomeada de amostra A, que foi enviada para análise externa, e amostra B, que teve uma concentração determinada pelo Laboratório de Cromatografia Líquida igual ao da amostra A, e 62 análises foram realizadas (n=5) segundo método oficial³⁴ e os parâmetros analíticos foram avaliados.

Para determinação da seletividade do equipamento, foi usado o valor de confiança do detector ao determinar o espectrograma do pico do ácido acético nas 62 amostras analisadas, comparando ao espectrograma da curva de calibração de ácido acético, o resultado foi de 98,9 a 99,8% de segurança na leitura do detector. Também não se constatou a eluição de nenhum outro composto no mesmo T_R do ácido acético em 4,47 min, o qual produziu um pico simétrico conforme o cromatograma de ácido acético na figura 5. De acordo com a ANVISA¹⁶, essas características comprovam a seletividade da metodologia;

Figura 6: Cromatograma de ácido acético



A aplicação da curva de calibração do equipamento produz um R^2 para determinar a confiança na faixa de aplicação e linearidade, conforme o gráfico da curva de calibração de ácido acético na figura 6 abaixo.

Figura 7: Curva de calibração de ácido acético

O R^2 possui um valor de 0,99998, maior que o mínimo de 0,990 estabelecido pela ANVISA^{16,26}, determinando que as concentrações da curva são conhecidas e a intensidade do sinal varia linearmente com a concentração dentro desta faixa;

Seguindo o tratamento estatístico de dados, foi obtido um desvio padrão agrupado de 0,092 g/100g e um coeficiente de variação de 1,78%, valor dentro do limite de 1 e 2%²⁶;

A análise independente identificou um total de 51400 ppm de ácido acético na amostra, o que equivale a 5,14 g/100. As amostras A e B foram analisadas e seus resultados foram tratados, a tabela 5 reúne esses resultados de amostras de vinagre de maçã:

Tabela 5: Resultados de amostras de vinagre de maçã

Amostra	Concentração média (g/100g)	Desvio Padrão (g/100g)	Coeficiente de Variação relativo
A	5,177	0,136	2,62%
B	5,169	0,116	2,24%

Estes resultados abrangem o resultado teórico da análise externa, qual foi considerado como verdadeiro, determinando que a análise é exata.

Os limites de detecção e quantificação podem ser definidos de 3 formas, através de método visual, relação do semi-ruído e pelo método baseado nos parâmetros analíticos. O método baseado nos parâmetros analíticos é o mais confiável e define os limites conforme²⁶:

Equação 5: Limite de Detecção

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S}$$

Equação 6: Limite de Quantificação

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S}$$

Onde s é o desvio padrão da metodologia e S é o coeficiente angular da curva de calibração (área x concentração). De acordo com a curva de calibração de ácido acético, o coeficiente angular é igual a 20930,90 g e a curva de calibração previamente definida é de 0,092. Com esses valores foi determinado LD igual a 0,000440 g/100g e LQ igual a 0,001319 g/100g, para metodologia ser validada, os resultados de LD e LQ precisam estar abaixo da faixa de concentração de interesse;

Para determinar robustez, de acordo com a literatura²⁶, a metodologia deve manter sua precisão com uma variação de 0,1 unidades de pH da fase móvel. Essa pequena variação foi observada em outubro de 2020, quando foi registrado uma fase móvel tampão de pH 2,6 ao invés de 2,4. Com estes resultados, foi encontrado um desvio padrão agrupado de 0,1048 e um coeficiente de variação relativo de 1,98%, como mostrado anteriormente, estes valores estão dentro do limite para garantir precisão, logo a metodologia pode ser considerada robusta.

A variação de 5 °C na análise foi usada para provar a robustez, e a temperatura foi alterada para 29 e 19 °C, realizando análises em triplicatas de uma mesma amostra de concentração conhecida, no entanto, essa variação de temperatura não causou mudança significativa nos resultados, por isso a variação de pH foi escolhida para determinar a robustez da metodologia.

7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Por possuir a precisão dos resultados dentro dos limites pelas agências competentes^{16, 26}, simplicidade e economia, a metodologia adaptada, metodologia 3, foi considerada a mais eficiente em termos de tempo técnico, volume de solventes, custo e resíduos produzidos para determinação de concentração de BaP em amostras de aroma de fumaça por CG/EM reduzindo o tempo de preparo de amostra para 5 minutos por amostra.

A partir dos resultados obtidos ao longo de 2021 e a reprodução da metodologia em amostras enviadas para análise externa, todos os parâmetros analíticos foram determinados dentro dos limites permitidos pelas agências reguladoras competentes^{16, 26}. Com a conclusão do período de estágio, a metodologia foi adicionada ao almanaque de metodologias do laboratório e ao sistema SE Suit como metodologia proposta para determinação de ácido acético.

8. CONTRIBUIÇÃO DO ESTÁGIO À FORMAÇÃO PROFISSIONAL

Através das experiências desenvolvidas no estágio, obtive um profundo conhecimento prático de cromatografia, sistemas de informação, dados de empresas e como organizar metodologias nesses sistemas.

Aprendi com profissionais experientes na área como desenvolver metodologias analíticas para análises de múltiplas matrizes por diferentes métodos e coloquei em prática trabalho em equipe e liderança.

Experimentei em primeira mão a realidade do controle de qualidade de uma grande empresa, com todas as dificuldades e burocracia por trás das aplicações laboratoriais no mercado, porém, com a ajuda de minhas colegas e supervisores, superamos os obstáculos e crescemos profissional e pessoalmente.

A contribuição para meu desenvolvimento profissional não foi somente em termos de crescimento pessoal e ganho de conhecimento, mas também na forma de contratação pela empresa após o término do período do estágio. Agradeço profundamente à Duas Rodas pelas oportunidades e por todos os colegas que fizeram e fazem parte desta jornada.

9. REFERÊNCIAS

- ¹DUAS RODAS. DuasRodas.com, 2021. **DUAS RODAS**. Disponível em: <https://www.duasrodas.com/empresa/>. Acesso em: 10/05/2021.
- ²OCP NEWS, Duas Rodas completa 95 anos com a marca histórica de R\$ 1 bilhão de faturamento. **OCP**. Disponível em: <https://ocp.news/informe/duas-rodas-completa-95-anos-com-a-marca-historica-de-r-1-bilhao-de-faturamento> Acessado em: 10/05/2021
- ³DCTECH. **Entendendo o sistema de um Cromatógrafo Gasoso (CG)**. CG | Cromatógrafo Gasoso. Disponível em: <https://www.dctech.com.br/entendendo-um-sistema-de-cromatografia-gasosa-cg/> Acessado em: 10/09/21
- ⁴COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. Fundamentos de cromatografia. **Campinas: Editora da UNICAMP**, 2006. p16-28.
- ⁵DCTECH. O guia definitivo para solução de problemas em HPLC. **DCTech Laboratory Technologies**. vol 1, ed 1, pg 6.
- ⁶Heliagon. Chromatogram in english. **Own work**. Disponível em: https://en.m.wikipedia.org/wiki/File:Chromatogram_in_English.svg. Acessado em: 08/09/21
- ⁷DCTech. Comparação dos perfis de separação de purê de fermentação usando colunas Eurokat Ca de diferentes tamanhos para um método analítico rápido. **DCTech**. Disponível em: <https://www.dctech.com.br/simulated-moving-bed-smb-uma-ferramenta-poderosa-para-purificacao-continua-de-xilitol>. Acessado em: 08/09/21
- ⁸HOFFMAN, E; STROOBANT, V. Mass spectrometry principles and applications 3^a ed. **Wiley**. pg 15-19
- ⁹SIMON, R.; PALME, S.; ANKLAM, E. Single-laboratory validation of a gas chromatography–mass spectrometry method for quantitation of 15 European priority polycyclic aromatic hydrocarbons in spiked smoke flavourings. **Journal of Chromatography A**, Geel, Belgium, 1103 (2006) 307–313, doi:10.1016/j.chroma.2005.11.020
- ¹⁰INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER – IARC. Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures: monographs on the evaluation of carcinogenic risks in humans. **IARC** Lyon: IARC, 2010.
- ¹¹SHIMADA, T. Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in the activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 24, n. 4, p. 257-276, 2006. PMID:16946553. <http://dx.doi.org/10.2133/dmpk.21.257>.

¹²TARANTINI, A.; MAITRE, A.; LEFEBVRE, E.; MARQUES, M.; RAJHI, A.; DOUKI, T. Polycyclic aromatic hydrocarbons in binary mixtures modulate the efficiency of benzo[a]pyrene to form DNA adducts in human cells. **Toxicology**, v. 279, n. 1-3, p. 36-44, 2011.

¹³DA PAZ, A. et al. Presença de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em produtos alimentícios e a sua relação com o método de cocção e a natureza do alimento. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 20, e2016102, 2017.

¹⁴PUBLIC HEALTH ENGLAND. Contaminated land information sheet: risk assessment approaches for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). **BRITISH HEALTH MINISTRY**. Disponível em: https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/671075/Contaminated_land_information_sheet_PAHs.pdf. Acessado em: 10/05/2021.

¹⁵NETO, J. O. Aspectos químicos e qualidade nutricional dos alimentos. **EMBRAPA**. 1, 1, 76, 2010

¹⁶INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA. OMS classifica carnes processadas como cancerígenas. **INCA**. Disponível em: [https://www.inca.gov.br/noticias/oms-classifica-carnes-processadas-como-cancerigenas#:~:text=As%20carnes%20processadas%20agora%20est%C3%A3o.em%20ingl%C3%AAs\)%2C%20da%20OMS](https://www.inca.gov.br/noticias/oms-classifica-carnes-processadas-como-cancerigenas#:~:text=As%20carnes%20processadas%20agora%20est%C3%A3o.em%20ingl%C3%AAs)%2C%20da%20OMS). Acessado em: 02/06/2021

¹⁷ANVISA. Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), Resolução RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007. REGULAMENTO TÉCNICO SOBRE ADITIVOS AROMATIZANTES. **Diário Oficial da União**, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

¹⁸EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY – EFSA. Amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for polycyclic aromatic hydrocarbons in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, L 215/4, 20.08.2011.

¹⁹EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY – EFSA. Safety of smoke flavour primary product - Scansmoke SEF7525 1 Opinion of the Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids (CEF). **EFSA**. Disponível em: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/j.efsa.2009.1093>. Disponível em: 12/05/2021. Acessado em: 10/05/2021.

²⁰CARUSO, Miriam Solange Fernandes; ALABURDA, Janete. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - benzo(a)pireno: uma revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz (Impr.)**, São Paulo, v. 67, n. 1, abr. 2008 . Disponível em: http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0073-98552008000100001&lng=pt&nrm=iso>. Acessado em: 10/05/2021.

²¹ANAV, Associação Nacional das Industrias de Vinagre. Clipping. **ANAV**. Disponível em: http://www.anav.com.br/clipping_interna.php?id=26 Acessado em: 03/09/2021

- ²²EBIHARA, K; NAKAJIMA, A. Effect of Acetic Acid and Vinegar on Blood Glucose and Insulin Responses to Orally Administered Sucrose and Starch. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 52, n.5, p.1311-1312.
- ²³BORTOLINI, F.; SANT'ANNA, E. S.; TORRES, R. C. Comportamento das fermentações alcoólica e acética de sucos de kiwi (*Actinida deliciosa*): composição dos mostos e métodos de fermentação acética. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 2, p. 236-243, 2001.
- ²⁴BRASIL. Serviço de Inspeção Federal (SIF). **Governo Federal**. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/sif> Acessado em: 02/09/2021
- ²⁵FAMBRAS HALAL. Como Certificar. **Fambras Halal**. Disponível em: [https://www.fambrashalal.com.br/como-certificar#:~:text=%C3%89%20um%20docum ento%20fiel%20de.pela%20jurisprud%C3%Aancia%20isl%C3%A2mica%20\(Sharia\)](https://www.fambrashalal.com.br/como-certificar#:~:text=%C3%89%20um%20docum ento%20fiel%20de.pela%20jurisprud%C3%Aancia%20isl%C3%A2mica%20(Sharia).). Acessado em 22/08/2021
- ²⁶RIBANI, et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quím. Nova**, 27 (5). 2004.
- ²⁷IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. **Blackwell Scientific Publications**, Oxford (1997). ISBN 0-9678550-9-8.
- ²⁸SIMON, R.; PALME, S.; ANKLAM, E. Single-laboratory validation of a gas chromatography–mass spectrometry method for quantitation of 15 European priority polycyclic aromatic hydrocarbons in spiked smoke flavourings. **Journal of Chromatography A**, 1103. 2006
- ²⁹J B Beach 1, E Pellizzari, J T Keever, L Ellis. Determination of benzo[a]pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) at trace levels in human tissues. **J Anal Toxicol**. 24(8):670-7. 2000
- ³⁰JIRA, W.; ZIEGENHALS, K.; SPEER, K. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method for the determination of 16 European priority polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products and edible oils. **Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess**. 2008 (6):704-13.
- ³¹YUAN, M. The Preparation and Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Meat by GC/MS. **Application Note**. Acessado em: https://www.perkinelmer.com/PDFs/downloads/APP_PAHinMeatbyGCMS.pdf
- ³²ANASTASSIADES, M.; ANASTASSIADES, L.; STAJNBHER, D. Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe (QuEChERS) approach for the determination of pesticide residues. **The 18th Annual Waste Testing and Quality Assurance (WTQA) symposium**. 231-241.
- ³³PRESTES O. D.; FRIGGI C. A.; ADAIME M. R.; ZANELLA, R. QuEChERS: um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de

pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Quím. Nova** 32 (6), 2009

³⁴AOAC, OFFICIAL METHOD 986.13: Quinic, Malic and Citric Acids in Cranberry Juice Cocktail and Apple Juice, **AOAC INTERNATIONAL**, 1989.

³⁵SLAUGHTER R. J et al. Isopropanol poisoning. **Clinical Toxicology**. 52 (5): 470–8.

³⁶HALL, R. M. Dangers of Bathtub Refinishing. **National Institute for Occupational Safety and Health**.

³⁷FAGIN, J; BRADLEY, J; WILLIAMS, D. Carbon monoxide poisoning secondary to inhaling methylene chloride. **Br Med J**. 281 (6253): 1461.

³⁸FALCON, G, et al. Enrichment of benzo[a]pyrene in smoked food products and determination by high-performance liquid chromatographyfluorescence detection. **Journal of Chromatography A**,. 753 (1996) 207-215

³⁹VALE, A. Methanol. **Medicine**. 35 (12): 633–4.

⁴⁰Braskem IN. FISPQ CICLOHEXANO. **Braskem**. Disponível em: <http://www.braskem.com.br/upload/FISPQ%20CICLOHEXANO.pdf> Acessado em 08/09/21

⁴¹AGILENT. Troubleshooting Gas Chromatograph: Baseline Problems. **Agilent Technologies**. Disponível em: <https://www.agilent.com/cs/library/Support/Documents/a16089.pdf> Acessado em: 28/08/2021

⁴²DECKER, D. Chromatography Problem Solving and Troubleshooting. **Journal of Chromatographic Science**, Volume 28, Issue 11, November 1990, Page 608.

⁴³COLE-PARMER. Achieving Low Levels of GC Column Bleed. **Technical Resource Library**. Disponível em: <https://www.coleparmer.com/tech-article/achieving-low-levels-gc-column-bleed> Acessado em: 02/09/2021

⁴⁴ZEEUW, J. [24] What do Chromatograms tell us? Base line is Rising with a Near Constant Slope. **Restek**. Disponível em: <https://academic.oup.com/chromsci/article-abstract/28/11/608/419682?redirectedFrom=PDF> Acessado em: 10/08/2021

Declaração de realização do estágio emitida pelo supervisor do local do estágio atestando o cumprimento das 450h referentes ao estágio supervisionado obrigatório.



DECLARAÇÃO DE ESTÁGIO OBRIGATÓRIO

A Empresa Duas Rodas Industrial Ltda. inscrito no CNPJ n. 84.430.149/0001-09, localizado na Rua Rodolfo Hufenuessler, número 755, bairro Centro, na cidade de Jaraguá do Sul/SC, declara que o aluno João Gabriel Moritz Lima, **CPF 100.155.679-82**, número de matrícula da UFSC 16100252, realizou estágio **OBRIGATÓRIO** referente a disciplina **Estágio Supervisionado (QMC 5515)** no **Laboratório de Cromatografia Líquida** entre o período de **10/03/2021** a **25/06/2021**, totalizando 450 horas.

A Instituição de Ensino UFSC em que o aluno estuda possui vínculo com esta **empresa ou órgão** e o aluno tem seu projeto de estágio de conclusão de curso supervisionado pelo **Gerente CLAUDIO ROBERTO LOPES DE SOUZA**, CRQ/SP [REDACTED], CPF [REDACTED]

Atenciosamente,

CLAUDIO ROBERTO LOPES DE SOUZA
Duas Rodas