

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Agrárias

Programa de Pós-graduação em Alimentos e Saúde

Marina Ranna Pinheiro Vasconcelos

**QUANTIFICAÇÃO DE CRESÓIS EM AMOSTRAS DE FUMAÇA LÍQUIDA
EMPREGANDO A EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO COM PURIFICAÇÃO EM
BAIXA TEMPERATURA E ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA -
ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

Montes Claros

2023

Marina Ranna Pinheiro Vasconcelos

**QUANTIFICAÇÃO DE CRESÓIS EM AMOSTRAS DE FUMAÇA LÍQUIDA
EMPREGANDO A EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO COM PURIFICAÇÃO EM
BAIXA TEMPERATURA E ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA -
ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

Versão final

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Saúde, do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Alimentos e Saúde.

Área de concentração: Processos e Controles em Ciências de Alimentos Aplicados à Saúde

Orientadora: Profa. Dra. Gevany Paulino de Pinho

Coorientador: Prof. Dr. Flaviano Oliveira Silvério

Montes Claros

2023

Vasconcelos, Marina Ranna Pinheiro.

V331q
2023

Quantificação de cresóis em amostras de fumaça líquida empregando a extração líquido-líquido com purificação em baixa temperatura e análise por cromatografia gasosa-espectrometria de massas [manuscrito] / Marina Ranna Pinheiro Vasconcelos. Montes Claros, 2023.
46 f.: il.

Dissertação (mestrado) - Área de concentração em Alimentos e Saúde. Universidade Federal de Minas Gerais / Instituto de Ciências Agrárias.

Orientadora: Gevany Paulino de Pinho.

Banca examinadora: Lázaro Chaves Sucupira, Janaina Teles de Faria.

Inclui referências: f. 42-46.

1. Fumaça líquida -- Teses. 2. Cresol -- Teses. 3. Química analítica quantitativa -- Teses. I. Pinho, Gevany Paulino de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 543




Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Agrárias
Curso de Mestrado em Alimentos e Saúde

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos 15 dia do mês de maio de 2023, às 14:00 horas, sob a Presidência da Profª Gevany Paulino de Pinho, Dr. Sc. (Orientadora – UFMG/ICA) e com a participação dos Professores Janaina Teles de Faria, Dr. Sc. (UFMG/ICA) e Lázaro Chaves Sicupira, Dr. Sc. (UFVJM), reuniu-se, presencialmente, a Banca de defesa de dissertação da Discente **MARINA RANNA PINHEIRO VASCONCELOS**, aluna do Curso de Mestrado em Alimentos e Saúde. O resultado da defesa de dissertação intitulada: "Quantificação de cresóis em amostras de fumaça líquida empregando a extração líquido-líquido com purificação em baixa temperatura e análise por cromatografia gasosa-espectrometria de massas" sendo a aluna considerada (aprovado(a)/reprovado(a)) aprovada. E, para constar, eu, Professora Gevany Paulino de Pinho, Presidente da Banca, lavrei a presente ata que depois de lida e aprovada, será assinada por mim e pelos demais membros da Banca examinadora.

OBS.: A aluna somente receberá o título após cumprir as exigências onde o candidato deverá, após a aprovação de sua Dissertação ou Tese e da realização das modificações propostas pela banca examinadora, se houver, encaminhar à secretaria do Colegiado do Programa, com a anuência do orientador, no mínimo 1 (um) exemplar impresso e 1 (um) exemplar eletrônico da dissertação no prazo máximo de 30 (trinta) dias.

Montes Claros, 15 de maio de 2023.


Janaina Teles de Faria
Membro


Lázaro Chaves Sicupira
Membro


Gevany Paulino de Pinho
Orientadora

Ao Senhor meu Deus.

Aos meus avós Maria e Wilson.

Aos meus pais Marlane e Marcelo.

Aos meus irmãos, família e amigos.

Minha eterna gratidão a vocês...

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por me dar forças para vencer todos os obstáculos desta caminhada.

Aos meus avós, Wilson e Maria, que mesmo não estando mais presente nesse plano me dão forças todo o tempo para seguir a minha caminhada.

Aos meus pais, Marcelo e Marlane, que sempre me apoiam e me incentivam a ser cada dia melhor.

Aos meus irmãos e a minha família, por sempre me apoiarem e serem a minha base e meu porto seguro.

Ao meu companheiro, Pedro, por todo amor, incentivo e cumplicidade dedicados a mim.

A minha tia Anézia, por me incentivar a fazer o mestrado, ao meu tio Higino, que me aconselhou em um momento de insegurança se deveria cursar o mestrado, e a minha amiga Ivy por me apoiar e não deixar desistir do sonho de entrar no mestrado.

Aos colegas do Grupo de Pesquisa em Agroquímica que participaram da execução deste trabalho, obrigada por partilharem desse sonho comigo e fazerem dos meus dias mais leves. Em especial a Gleison, Junaí, Karine, Lucélio e Maria Eduarda.

Ao Laboratório de Química Instrumental da UFMG (LQI - UFMG).

Ao corpo técnico do LQI - UFMG, Ane Patrícia Cacique e Érica Soares Barbosa.

Aos meus orientadores, Professora Gevany e Professor Flaviano, pela confiança, ensinamentos e compreensão. Vocês foram fundamentais para que eu concluísse mais essa etapa da minha vida.

A Pró-reitoria de Pesquisa - UFMG.

Ao Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais (ICA/UFMG) pela oportunidade de realização do mestrado e infraestrutura disponibilizada.

À FAPEMIG pelo auxílio financeiro, permitindo a condução desta pesquisa.

Por fim, a todos aqueles que colaboraram para a conclusão deste trabalho.

Muito obrigada!

*“Não há progresso sem esforços, vitória sem lutas,
aperfeiçoamento sem sacrifícios, como não
existe tranquilidade sem paciência.”*

Chico Xavier

RESUMO

Fumaça líquida é um aditivo alimentar usado para conferir o sabor defumado em alimentos. Entre os constituintes da fumaça líquida estão os três isômeros dos cresóis, que são compostos potencialmente tóxicos para a saúde humana. Dessa forma, o principal objetivo desse estudo foi otimizar uma metodologia para quantificar cresóis em fumaça líquida. Primeiramente, a técnica de extração líquido-líquido com purificação em baixa temperatura (ELL-PBT) foi otimizada e validada para cresóis em água, pois não há amostras de fumaça líquida isentas de cresóis. As análises foram realizadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) com cromatogramas de íons totais. Posteriormente, a ELL-PBT foi aplicada para a extração de cresóis em cinco amostras comerciais de fumaça líquida e a quantificação foi realizada a partir dos padrões de calibração em solvente puro e a partir do método de adição de padrão. A estabilidade dos cresóis em fumaça líquida também foi avaliada por 21 dias com as amostras armazenadas em condições ambientes e refrigeradas. A metodologia proposta mostrou-se seletiva para cresóis em água, linear na faixa de 0,5 a 35 mg L⁻¹, recuperação entre 90 e 104% e desvio-padrão relativo (DPR) inferior a 10%. A quantificação de cresóis em quatro amostras de fumaça líquida apresentou um forte efeito de matriz negativo e a concentração dos cresóis variaram de 0,5 a 25 mg L⁻¹ determinadas pelo método de adição de padrão. A concentração dos cresóis permaneceu constante na fumaça líquida durante 21 dias a 5 e 25 °C. Finalmente, a metodologia proposta mostrou-se adequada para a determinação de cresóis em fumaça líquida e os níveis encontrados nas amostras são muito elevados.

Palavras-chaves: Efeito de matriz. Método adição de padrão. Validação. Fumaça líquida. Cresol.

ABSTRACT

Liquid smoke is a food additive used to impart a smoky flavor to foods. The three isomers of cresols are among the constituents of liquid smoke, which are potentially toxic compounds for human health. Thus, the main objective of this study was to optimize a methodology to quantify cresols in liquid smoke. First, the liquid-liquid extraction with low temperature purification (LLE-LTP) technique was optimized and validated for cresols in water, as there are no liquid smoke samples free of cresols. Analyses were performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) with total ion chromatograms. Subsequently, the LLE-LTP was applied for the extraction of cresols in five commercial samples of liquid smoke and the quantification was performed using the calibration standards in pure solvent and using the standard addition method. The stability of cresols in liquid smoke was also evaluated for 21 days with samples stored under ambient and refrigerated conditions. The proposed methodology proved to be selective for cresols in water, linear in the range of 0.5 to 35 mg L⁻¹, recovery between 90 and 104% and relative standard deviation (RSD) lower than 10%. The quantification of cresols in four liquid smoke samples showed a strong negative matrix effect and the concentration of cresols ranged from 0.5 to 25 mg L⁻¹ determined by the standard addition method. The cresol concentration remained constant in the liquid smoke for 21 days at 5 and 25 °C. Finally, the proposed methodology proved to be adequate for the determination of cresols in liquid smoke and the levels found in the samples are very high.

Keywords: Matrix effect. Standard addition method. Validation. Liquid smoke. Cresol.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fórmula química dos isômeros (o-cresol, m-cresol, p-cresol).....	16
Figura 2 – Cromatograma de íons totais das amostras de fumaças líquidas, A1, A2, A3, A4 e A5, respectivamente.	28
Figura 3 – Cromatogramas de íons totais de extratos obtidos a partir da ELL-PBT. (A) extrato da matriz fortificado com solução padrão de cresóis a 0,5 mg L-1 (padrão de calibração). (B) extrato não fortificado (branco).....	30
Figura 4 – Dados da calibração obtidos a partir da análise de soluções padrão de cresóis em acetonitrila por CG-EM. A, B e C refere-se ao o-cresol, m-cresol e p-cresol, respectivamente	33
Figura 5 – Gráficos dos resíduos da regressão das curvas analíticas para o-cresol, m-cresol e p-cresol (0,5 a 35 mg L-1) em acetonitrila, com indicação dos respectivos outliers diagnosticados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife, sendo ● = outlier; linha pontilhada = $\pm t_{crit}(0,95;n-p-1)$ Sres	34
Figura 6 – Imagens das amostras de fumaça líquida. A) Antes da ELL-PBT. B) Após adição de acetonitrila. C) Após a ELL-PBT completa.....	36
Figura 7 – Concentração de cresóis em amostra (A5) de fumaça líquida empregando o Teste de Estabilidade. A) Amostra de fumaça líquida em temperatura ambiente. B) Amostra de fumaça líquida refrigerada.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Descrição de amostras de fumaça líquida empregadas nestes estudos.....	24
Tabela 2 – Concentrações de fortificação das amostras de fumaça líquida (A) para quantificação de cresóis pelo método de adição de padrão	27
Tabela 3 – Dados para LQ, calibração, exatidão e precisão da ELL-PBT de cresóis em amostras de água e análise por CG-EM a partir do cromatograma de íons totais.....	31
Tabela 4 – Concentração dos cresóis em amostras de fumaça líquida (A) determinada a partir da calibração em solvente puro e método de adição de padrão	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CG	–	Cromatografia gasosa
DIC	–	Detector ionização em chamas
DPR	–	Desvio padrão relativo
DP	–	Desvio padrão
ELL-PBT	–	Extração líquido-líquido com purificação em baixa temperatura
EM	–	Detectores espectrômetro de massas
HPA	–	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
LD	–	Limite de detecção
LQ	–	Limite de quantificação
MMQO	–	Método dos mínimos quadrados ordinários

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	Cresóis	16
2.2	Fumaça Líquida	17
2.3	ELL-PBT	18
2.4	Validação	18
2.4.1	Seletividade	18
2.4.2	Linearidade	19
2.4.3	Limite de quantificação	19
2.4.4	Exatidão	19
2.4.5	Precisão.....	20
2.5	Efeito de matriz	20
2.6	Adição de Padrão.....	21
3	OBJETIVOS.....	22
3.1	Objetivo geral	22
3.2	Objetivos específicos.....	22
4	MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1	Reagentes.....	23
4.2	Equipamentos	23
4.3	Amostras de Fumaça Líquida.....	24
4.4	Extração Líquido - Líquido com Purificação em Baixa Temperatura (ELL-PBT).....	24
4.5	Derivatização	25
4.6	Validação	25
4.6.1	Seletividade	25
4.6.2	Limite de Quantificação	25
4.6.3	Linearidade do Método.....	26
4.6.4	Exatidão e Precisão.....	26
4.7	Quantificação de Cresóis em Amostras de Fumaça Líquida.....	26
4.8	Teste de Estabilidade	27
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1	ELL-PBT para cresóis em água.....	29

5.2	Validação	30
5.2.1	Seletividade	30
5.2.2	Limite de Quantificação	31
5.2.3	Linearidade	32
5.2.4	Exatidão e Precisão.....	35
5.3	ELL-PBT de cresóis em fumaça líquida.....	36
5.4	Quantificação de cresóis em amostras de fumaça líquida	37
5.5	Teste de Estabilidade	38
6	CONCLUSÃO	40
	REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

A fumaça líquida é um aditivo alimentar produzido a partir da pirólise da madeira e que tem sido amplamente utilizada no mundo todo para conferir o sabor defumado em alimentos processados, refeições em restaurantes, lanches e alimentos caseiros (Varlet et al., 2010). Entretanto, contaminantes químicos potencialmente tóxicos podem estar presentes na fumaça líquida e serem transferidos para o alimento, expondo diretamente o ser humano a essas substâncias e causando impactos negativos na saúde (Yabiku et al., 1993; Simko, 2005).

Entre os contaminantes químicos presentes na fumaça líquida estão os cresóis (o-cresol, m-cresol e p-cresol), os quais são produzidos a partir da pirólise da lignina a cerca de 400 °C (Guillen e Ibargoitia, 1999; Guillen e Manzanos, 1999; Simon et al., 2005). Embora os cresóis sejam reconhecidos como contaminantes químicos ambientais devido a sua frequência e toxicidade para a saúde humana (ATSDR, 2021), os mesmos compostos ainda são vistos pela indústria de alimentos apenas como um constituinte do flavour em produtos defumados ou saborizados com fumaça líquida (Lustre e Issenberg, 1970; Mcsweeney e Sousa, 2000; Ojeda et al., 2002; Marilley e Casey, 2004; Kostyra e Baryłko-Pikieln, 2006).

Estudos prévios têm mostrado uma série de impactos na saúde humana do p-cresol, pois ele é também produzido no intestino a partir do metabolismo da tirosina por bactérias endógenas (Saito et al., 2018). Níveis elevados de p-cresol no organismo estão associados a doenças renais crônicas (Levey et al., 2007; Rong e Kiang, 2020), problemas cardiovasculares (Levey et al., 2007; Saito et al., 2018; Liu et al., 2018), inflamação do cólon (O'Keefe, 2016) e síndrome do espectro do autismo (Persico e Napolini, 2012). Além disso, estudos in vitro têm mostrado que p-cresol em elevadas concentrações é genotóxico para os colonócitos (Andriamihaja et al., 2015). Diante dessa preocupação sobre os impactos dos cresóis na saúde humana, o desenvolvimento de metodologias para quantificar cresóis em fumaça líquida torna-se relevante, pois as que estão disponíveis na literatura são apenas para análises semiquantitativas (Guillen e Ibargoitia, 1999).

Um dos maiores desafios para o desenvolvimento de método de extração de cresóis em fumaça líquida deve-se à ausência de uma amostra isenta de cresóis (branco). Nessas circunstâncias, uma amostra representativa, como por exemplo água, pode ser usada durante a otimização e validação do método proposto. Um ponto importante a ser considerado é que a eficiência de extração dos cresóis em água e fumaça líquida podem alcançar resultados semelhantes, porém não considera o efeito de matriz de ambas as amostras durante as análises

cromatográficas (Hajslová et al., 1998). Dessa forma, a quantificação dos cresóis em fumaça líquida, por ser uma amostra muito complexa, pode seguir as recomendações do documento N° SANTE/12682/2019 (Comissão Europeia, 2019), o qual sugere o método de adição de padrão quando nenhuma amostra branca está disponível para preparar soluções padrão na matriz.

A técnica de extração líquido-líquido com purificação em baixa temperatura (ELL-PBT) é uma alternativa viável para a extração de cresóis em amostras essencialmente aquosas, pois apresenta custo acessível, de fácil execução, possibilita a extração e limpeza dos extratos simultaneamente e principalmente, é uma técnica compatível com as análises cromatográficas (Pinho et al., 2010; Rübensam et al., 2011; Andrade et al., 2013).

A cromatografia gasosa (CG) tem sido a melhor opção para a identificação e quantificação dos três cresóis individualmente, embora requer uma etapa prévia de derivatização para a separação dos isômeros m-cresol e p-cresol (Oshiro et al., 2022). A quantificação de cresóis em extratos de fumaça líquida pode ser realizada usando os detectores espectrômetro de massas (EM) com cromatogramas de íons totais ou detector ionização em chamas (DIC), pois os níveis de cresóis estão na ordem de mg L^{-1} nessas amostras (Arevalo et al., 2020).

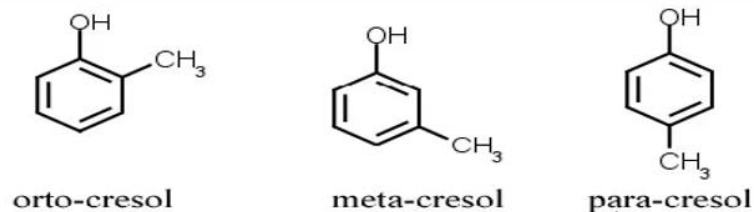
Finalmente, os objetivos deste estudo foram validar a ELL-PBT para cresóis em amostras de água e aplicar a mesma metodologia em amostras de fumaça líquida. A quantificação dos cresóis em cinco amostras comerciais de fumaça líquida foi realizada a partir dos padrões de calibração em solvente puro e a partir do método de adição de padrão.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cresóis

Os cresóis, representados na Figura 1, são um grupo de substâncias químicas derivadas do fenol e são constituídos pelos isômeros *o*-cresol, *m*-cresol e *p*-cresol. Esses compostos são introduzidos no meio ambiente por ações antropogênicas, principalmente de interesses industriais, ou podem ser formados naturalmente por ação de microrganismos (WHO, 1996).

Figura 1 – Fórmula química dos isômeros (*o*-cresol, *m*-cresol, *p*-cresol).



Fonte: Da autora, 2022.

Os cresóis são considerados substâncias potencialmente tóxicas e por isso o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) recomendou o monitoramento de cresóis em solo para aplicações agrícolas (Resolução N° 375 de 2006), com limite máximo de resíduos de 160 $\mu\text{g kg}^{-1}$, não é estipulado esse limite para alimentos. A ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) dos Estados Unidos inseriu os cresóis na lista de poluentes prioritários devido à sua frequência e toxicidade. Além disso, A EPA (Environmental Protection Agency) dos Estados Unidos considerou os cresóis como substâncias potencialmente carcinogênicas.

Os isômeros de cresóis são usados individualmente ou em misturas na produção de desinfetantes, conservantes, corantes, fragrâncias, herbicidas, inseticidas, explosivos e como antioxidantes usados para estabilizar óleos lubrificantes, combustíveis para motores, borracha, polímeros, elastômeros e alimentos. Misturas de cresóis são usadas em conservantes de madeira e em solventes para revestimentos de resinas sintéticas, agentes desengordurantes, flotação de minérios, tintas e produtos têxteis. Cresóis ocorrem naturalmente em óleos de algumas plantas e são formados durante a combustão de cigarros, combustíveis à base de petróleo, carvão, madeira e outros produtos (IPCS, 1995; Olmos *et al.*, 2004; Bay *et al.*, 2014).

2.2 Fumaça Líquida

Uma das técnicas mais antigas de preservar alimentos é a defumação, o alimento é submetido a ação da fumaça, resultante da pirólise (Knockaert, 2002). Podendo ser utilizada para conservação de alimentos e garantindo a sua segurança alimentar (Schubring, 2008; Martin *et al.*, 2010). Os compostos presentes na fumaça líquida foram propostos como eficazes contra muitos deteriorantes e microorganismos patogênicos (Milly *et al.*, 2005). A aplicação da fumaça líquida pode aumentar o prazo de validade dos alimentos (Ramakrishnan e Moeller, 2002; Cadwallader, 2007).

A fumaça líquida é obtida a partir da condensação da fumaça de madeira produzida pela combustão lenta das lascas de madeira ou serragem sob condições limitadas de oxigênio (Montazeri *et al.*, 2013). A composição química da fumaça líquida depende do tipo da madeira utilizado e do seu teor de umidade, que influenciará na temperatura e duração da pirólise na geração da fumaça (Guillen e Ibargoitia, 1999; Montazeri *et al.*, 2013). Parte dos componentes da fumaça são solubilizados na água, principalmente aqueles responsáveis pelo *flavour*, enquanto outros componentes, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são eliminados. Os cresóis são formados a partir da degradação da lignina e ficam solúveis na fração aquosa, entrando na composição química do produto comercial (Simon *et al.*, 2005; Guillen e Ibargoitia, 1999; Guillen e Manzanos, 1999).

Uma das principais razões para o grande uso de fumaça líquida ao invés da defumação tradicional, além da praticidade de aplicação, é a possibilidade de remoção de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPA's), gerado na fumaça durante o processo. Muitos HPA's são considerados carcinogênicos, destacando-se o benzo(a)pireno, que também pode causar defeitos congênitos, malformações fetais e vários danos á saúde (Abdel-Shafy e Mansour, 2015; FSAI, 2015).

A defumação é aplicada a produtos cárneos, queijos, cogumelos, chás e principalmente peixes (Fellows, 2017). O consumo desses produtos é crescente, sendo cada vez mais apreciado pelo seu agradável aroma e sabor defumado (Guillen e Ibar goitia, 1999).

¹ *Flavour*: Conjunto de impressões olfativas e gustativas provocadas no momento do consumo do alimento.

2.3 ELL-PBT

A ELL-PBT é uma técnica promissora para diferentes matrizes complexas, ela tem a vantagem de promover tanto a extração, quanto a limpeza em uma única etapa, sem precisar de um procedimento adicional, como ocorre em outros processos (Pozzebon et al., 2003; Myasein et al., 2009; Araújo et al., 2016).

O método de ELL-PBT é baseado na separação dos analitos entre as fases aquosa e orgânica, obtida com o abaixamento da temperatura (-20 °C) (Pinho, 2010). A vantagem desse método é que os componentes da amostra são congelados com a fase aquosa, enquanto que os analitos de interesse são extraídos pela fase orgânica (Vieira et al., 2007).

O método é prático, com número reduzido de etapas, baixo consumo de solventes orgânicos. É um método simples, seletivo, confiável e rápido (Vieira, 2007; Goulart, 2008).

2.4 Validação

A etapa de validação é utilizada para atestar a confiabilidade de um método e produzir dados referentes a uma amostra (Ribani et al., 2004). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO, 2003), disponibilizam protocolos para que seja realizada a etapa de validação.

Alguns parâmetros analíticos são testados no processo de validação adequando-se aos objetivos de uso do método. Os parâmetros analíticos de validação são: seletividade, limite de quantificação (LQ), linearidade, exatidão e precisão (Ribani et al., 2004). O efeito de matriz também é um parâmetro a ser avaliado.

2.4.1 Seletividade

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias examinadas na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. A seletividade avalia o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos que possam estar presentes. A seletividade garante que o pico de resposta seja apenas do composto de interesse (Ribani et al., 2004).

A seletividade pode ser obtida comparando o cromatograma da matriz isenta da substância de interesse (o branco) e a matriz fortificada com o padrão, sendo que, nenhum sinal cromatográfico deve aparecer no tempo de retenção da substância de interesse, a qual deve estar bem separada dos demais compostos presentes na amostra (ICH, 2022).

2.4.2 Linearidade

A linearidade corresponde a uma faixa de concentração em que a resposta apresentada pelo método seja proporcional à concentração do analito. O modelo linear de resposta é obtido através da análise de regressão do sinal analítico em função da concentração do analito estabelecidos na curva de calibração, produzindo a resposta esperada (ICH, 2022).

2.4.3 Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em análise que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental (INMETRO, 2003; ICH, 2022).

A relação sinal: ruído é a mais utilizada para procedimentos analíticos que mostram o ruído da linha de base. Para que seja determinada essa relação é feita a comparação entre a medição dos sinais de amostras em baixas concentrações conhecidas do composto de interesse na matriz e um branco (matriz isenta do composto de interesse) dessas amostras. Portanto, para o LQ é estabelecida uma concentração mínima na qual a substância pode ser facilmente quantificada. A relação sinal: ruído pode ser de 10:1 (ICH, 2022).

2.4.4 Exatidão

Representa o grau de aceitabilidade entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como real (INMETRO, 2003)

A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança (é sempre associada a valores de precisão). O número de ensaios varia segundo a legislação ou diretriz adotada e também com as particularidades da pesquisa. A ICH estabelece que um mínimo de nove determinações envolvendo um mínimo de três diferentes níveis de concentração deve ser obedecido (ICH, 2022). Por exemplo, ensaios em triplicata para três níveis de concentração (ANVISA, 2003).

2.4.5 Precisão

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições estabelecidas. É considerada em três níveis diferentes: repetitividade; precisão; reprodutibilidade (Ribani et al., 2004). A precisão pode ser analisada pelo desvio padrão relativo, obtido em experimentos de fortificação/recuperação do analito, normalmente menor que 20% (Thompson; Ellisson; Wood, 2002; INMETRO, 2003; ICH, 2022).

Para a repetitividade, o INMETRO recomenda sete ou mais repetições para o cálculo da estimativa do desvio padrão. A ICH e ANVISA sugerem que a repetitividade seja verificada a partir de um mínimo de nove determinações cobrindo o limite especificado do procedimento (ex.: três níveis, três repetições cada um), ou a partir de um mínimo de seis determinações a uma concentração próxima ao valor esperado.

2.5 Efeito de matriz

Efeito de matriz é a interferência dos componentes da matriz na quantificação dos analitos na análise cromatográfica (Gonzalez et al., 2002). Com o efeito de matriz pode ocorrer uma superestimação dos resultados (efeito de matriz positivo), pois quando as soluções padrão são preparadas em solvente puro e analisadas por cromatografia, mais sítios ativos do liner estão disponíveis para interagir com os analitos. E quando são realizadas as análises dos extratos, os analitos competem com os componentes da matriz pelos sítios ativos do liner, com isso, mais analitos são introduzidos na coluna cromatográfica, sendo detectados e obtendo uma maior resposta em relação ao padrão no solvente. Ou uma subestimação dos resultados (efeito de matriz negativo), ocorrendo o oposto do que foi explicado acima, serão introduzidos menos analitos na coluna cromatográfica, obtendo uma menor resposta em relação ao padrão em solvente (Hajslvá e Zrostliková, 2003).

A intensidade do efeito de matriz pode variar de acordo com a amostra, ou com a concentração do analito na matriz. O próprio sistema cromatográfico pode influenciar na intensidade do efeito de matriz (Pinho, 2007).

2.6 Adição de Padrão

O método de adição de padrão é de grande importância, principalmente nas áreas de métodos instrumentais, onde a utilidade inerente do instrumento pode ser reduzida por uma configuração inadequada do sistema químico (efeitos de matriz de amostra). O método de adição de padrão requer adições progressivas de quantidades conhecidas do analito à amostra. Obtendo uma resposta linear do sistema de detecção, será necessário realizar um cálculo de regressão linear que permite avaliar a concentração original independente do efeito da matriz, fornecendo informações sobre a magnitude desse efeito (Bader, 1980).

O método de adição padrão é utilizado para calibrar instrumentos analíticos que o sinal é afetado por componentes da matriz de amostra que variam de forma imprevisível entre as amostras. O impacto da matriz na intensidade do sinal é conhecido como efeito de matriz. O método compensa os efeitos da matriz realizando a calibração do instrumento na matriz da amostra por meio da adição de quantidades conhecidas do analito à amostra (Hidi et al., 2016).

O método de adição padrão pode ser utilizado para compensar efeitos de matriz. A adição de padrão pode compensar interferências não espectrais e certos tipos de interferências espectrais, que aumentam ou diminuem o sinal analítico da concentração do analito (Bosch-Reig e Campins-Falco, 1990).

O método de adição padrão consiste na adição de quantidades conhecidas da substância de interesse que está sendo analisada a quantidades conhecidas da amostra, antes do seu preparo. Estas amostras com o padrão incorporado são utilizadas para a obtenção dos cromatogramas. Constrói-se uma curva analítica relacionando as quantidades da substância adicionada à amostra com as respectivas áreas obtidas. O ponto onde a reta corta o eixo das ordenadas corresponde à área do pico da substância que está sendo determinada, sem qualquer adição do padrão. A extrapolação da reta define, no eixo das abcissas, a concentração da substância na amostra analisada (Berg, Murta e Kugler, 1988).

O método de adição padrão é trabalhoso, mas é de grande importância quando a amostra é muito complexa, quando as interações com a matriz são significativas e quando houver dificuldade de encontrar um padrão interno adequado ou uma matriz isenta da substância de interesse (Snyder, Kirkland e Glajch, 1997)

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Validar a ELL-PBT para a extração de cresóis em água e aplicar a metodologia para quantificação dos mesmos compostos em fumaça líquida.

3.2 Objetivos específicos

- Aplicar as condições ótimas de análises por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas para o o-cresol, m-cresol e p-cresol;
- Aplicar as condições ótimas de derivatização dos três isômeros dos cresóis;
- Aplicar a ELL-PBT para cresóis em amostras de água;
- Validar a ELL-PBT para os cresóis em amostras de água;
- Aplicar a metodologia validada para a quantificação dos três isômeros dos cresóis em cinco amostras de fumaça líquida comercial;
- Avaliar a estabilidade dos cresóis nas amostras de fumaça líquida comercial durante o período de 21 dias.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reagentes

Os padrões analíticos *o*-cresol, *m*-cresol e *p*-cresol foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), com pureza de 99,9%. Uma solução padrão estoque de cada cresol foi preparada na concentração de 2000 mg L⁻¹ em acetonitrila grau HPLC da Merck (São Paulo, Brasil). A partir dessas soluções foi preparada uma solução intermediária de trabalho contendo os três cresóis a 100 mg L⁻¹. As soluções foram armazenadas em ambiente refrigerado, em frasco âmbar.

O solvente orgânico grau analítico acetonitrila da Êxodo científica (São Paulo, Brasil), foi utilizado durante a etapa de extração. Para a derivatização dos cresóis foram utilizados piridina anidra com pureza 99,8% e anidrido acético grau analítico, ambos da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Sulfato de sódio anidro obtido da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil) foi submetido ao aquecimento em forno mufla Quimis/Q318M24 à 300° C por 2 h para remoção de possíveis interferentes.

4.2 Equipamentos

Na etapa de preparo de amostras foram utilizados um vórtex Scilogex/MX-5 (Rocky Hill, USA), uma centrífuga kindly/KC5 (São Paulo, Brasil) e uma balança Shimadzu/AW220 (São Paulo, Brasil).

Os extratos foram analisados utilizando um cromatógrafo a gás da Agilent Technologies (CG 7890A) acoplado a um espectrômetro de massas (EM 5957C). Uma coluna capilar de sílica fundida SLB®-5 ms da Merck (Darmstadt, Germany) 30 m de comprimento x 0,32 mm de diâmetro interno x 0,25 µm espessura do filme interno foi usado para separação dos compostos. Hélio (pureza de 99,9999%) foi utilizado como gás de arraste a uma taxa de 1 mL min⁻¹. O injetor foi mantido a 270° C e 1 µL de amostra foi injetado com divisão de fluxo (split 1:5) no *liner* sem lã de vidro, utilizando um auto injetor CombiPAL. A programação de temperatura do forno iniciou em 75 °C com isoterma de 1 min, seguida por uma taxa de aquecimento de 5 °C min⁻¹ até 115 °C e, posteriormente, uma taxa de aquecimento de 30 °C min⁻¹ até 300 °C em um tempo total de análise de 17 min. O espectrômetro de massas foi operado no modo de ionização por impacto de elétrons a 70 eV e analisador de massas tipo quadruplo. A interface foi mantida a 280 °C e a fonte de íons a 230 °C. O controle e obtenção

de dados foram feitos com o software ChemStation (E.02.02.1431 copyright 1989-2011) da Agilent Technology. As análises foram realizadas selecionando os íons no intervalo de 40 a 400 m/z para análise de *o*-cresol, *m*-cresol e *p*-cresol.

4.3 Amostras de Fumaça Líquida

As amostras comerciais de fumaça líquida foram adquiridas de comércios locais e no comércio online.

Tabela 1 – Descrição de amostras de fumaça líquida empregadas nestes estudos

Amostra	Origem
A1	Madeira de frutífera (macieira e pessegueira)
A2	Madeira de eucalipto
A3	Madeira hickory
A4	Madeira mesquite
A5	Madeira de eucalipto com corante de caramelo

Fonte: Da autora, 2022.

Para a etapa de validação do método de extração, foi empregado amostras de água ultrapura.

4.4 Extração Líquido - Líquido com Purificação em Baixa Temperatura (ELL-PBT)

O procedimento analítico consistiu em adicionar 4,00 mL de amostra em um *vial* de vidro transparente (22 mL), seguido pela adição de 8 mL de acetonitrila. O frasco foi homogeneizado em vórtex por 30 s e refrigerado a -28 °C por 60 min. Após o congelamento da fase aquosa, 3 mL de fase orgânica líquida foram transferidos para um tubo falcon (15 mL) contendo 500 mg de sulfato de sódio anidro. Em seguida, o tubo foi homogeneizado em vórtex por 30 s e centrifugado por 5 min a 4000 rpm. Uma alíquota de 1 mL do sobrenadante foi transferida para um *vial* (2 mL) e armazenado a -28 °C até o momento da derivatização.

4.5 Derivatização

As soluções padrão dos cresóis em acetonitrila, bem como os extratos obtidos a partir da ELL-PBT foram derivatizados antes das análises cromatográficas. Para isso, foram transferidos para o *vial* de injeção (2 mL), 1 mL de extrato da matriz ou solução padrão, 20 μ L de piridina anidra e 100 μ L de anidrido acético. O *vial* foi mantido a 25 °C por 30 min. A solução derivatizada foi armazenada a -28 °C até ser analisada por CG-EM. Os analitos-alvo derivatizados foram estáveis por 48 h.

4.6 Validação

Conforme mencionado anteriormente, amostras de água foram utilizadas como matriz representativa para validar a extração de cresóis pela ELL-PBT e análise por CG-EM. Vale destacar que a validação ocorreu em nível de ppm (mg L^{-1}) porque a concentração esperada para cresóis em amostras de fumaça líquida está nessa faixa de concentração. O método proposto foi validado seguindo as recomendações do documento No SANTE/12682/2019 (Comissão Européia, 2019). Os parâmetros de validação avaliados foram a seletividade, limite de quantificação (LQ), linearidade, efeito de matriz, precisão e exatidão.

4.6.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada por meio da comparação de cromatogramas do extrato de água livre de cresóis (extrato branco) com cromatogramas do extrato da matriz fortificada com soluções padrões de cresóis, na concentração de 0,5 mg L^{-1} . O método poderá ser considerado seletivo quando não for observado sinais cromatográficos atribuídos a interferentes no mesmo tempo de retenção dos cresóis.

4.6.2 Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LQ) foi determinado por meio de experimentos de fortificação das amostras de água com a menor concentração de cresóis na qual é possível quantificar com exatidão e precisão. Além disso, o LQ foi considerado a menor concentração que resultou em um sinal analítico com intensidade 10 vezes maior que o sinal do ruído da linha de base do cromatograma do extrato branco, no mesmo tempo de retenção dos cresóis.

4.6.3 Linearidade do Método

A faixa linear do método foi determinada a partir da análise de soluções padrão de calibração dos cresóis em oito níveis de concentração, sendo a menor concentração equivalente ao LQ do método. As soluções padrão de calibração foram preparadas em acetonitrila nas concentrações 0,50; 5,00; 10,00; 15,00; 20,00; 25,00; 30,00 e 35,00 mg L⁻¹. As análises por CG-EM foram realizadas em triplicatas para cada nível.

Os parâmetros da regressão foram estimados pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) aplicado ao modelo linear. Em seguida, gráficos dos resíduos da regressão foram construídos e examinados para identificação de *outliers*, sendo no máximo excluídos 22,2% do número original de resultados, não podendo excluir um nível completo.

4.6.4 Exatidão e Precisão

A exatidão foi avaliada a partir de experimentos de fortificação/recuperação. Para isso, amostras de água foi fortificada em três níveis de concentração dos cresóis, 1xLQ, 10xLQ e 50xLQ. Essas amostras em triplicatas foram submetidas à ELL-PBT e analisadas por CG-EM. Para cada nível, os valores de recuperação entre 70 e 120% foram considerados aceitáveis.

A precisão do método foi verificada sob condições de repetitividade, determinando o desvio padrão relativo (DPR). Para isso, amostras de água foram fortificadas em sete repetições na concentração de 10xLQ. O critério de aceitabilidade para o DPR foi para valores menores que 20%.

4.7 Quantificação de Cresóis em Amostras de Fumaça Líquida

A) Padrão de Calibração em Solvente

A metodologia validada para a extração de cresóis em água, foi aplicada para a quantificação dos mesmos três cresóis em cinco amostras de fumaça líquida comercial. Dessa forma, no procedimento descrito anteriormente para a Extração Líquido-Líquido com Purificação em Baixa Temperatura (ELL-PBT) foram utilizados 4 mL de fumaça líquida. Após a ELL-PBT, o extrato foi submetido à derivatização e analisado por CG-EM. Os cresóis presentes nos extratos das amostras de fumaça líquida foram quantificados usando os dados

do modelo linear obtido a partir das análises dos padrões de calibração em solvente puro (linearidade do método).

B) Método de Adição de Padrão

Amostras de fumaça líquida de 4 mL foram transferidas para *vials* transparentes de 22 mL. Essas amostras foram fortificadas com solução padrão dos cresóis em quatro níveis de concentração. A quantidade do padrão adicionado em cada *vial* foi cerca de zero a cinco vezes a concentração de cresóis presentes nas amostras de fumaça líquida, as quais foram estimadas a partir de padrões de calibração em solvente puro (item anterior). As amostras fortificadas foram submetidas à ELL-PBT e, em seguida, os extratos obtidos foram derivatizados e analisados por CG-EM. Os experimentos foram realizados em triplicata. Na Tabela 2 são apresentadas as concentrações dos cresóis adicionadas em cada amostra de fumaça líquida.

Tabela 2 – Concentrações de fortificação das amostras de fumaça líquida (A) para quantificação de cresóis pelo método de adição de padrão

Amostras	Nível 1	Nível 2	Nível 3	Nível 4
A1	0 mg L ⁻¹	5 mg L ⁻¹	10 mg L ⁻¹	15 mg L ⁻¹
A2	0 mg L ⁻¹	25 mg L ⁻¹	50 mg L ⁻¹	75 mg L ⁻¹
A3	0 mg L ⁻¹	5 mg L ⁻¹	10 mg L ⁻¹	15 mg L ⁻¹
A4	0 mg L ⁻¹	5 mg L ⁻¹	10 mg L ⁻¹	15 mg L ⁻¹
A5	0 mg L ⁻¹	20 mg L ⁻¹	40 mg L ⁻¹	80 mg L ⁻¹

*As amostras A1, A2, A3, A4 e A5 correspondem às amostras de fumaças líquidas adquiridas comercialmente.

Fonte: Da autora, 2022.

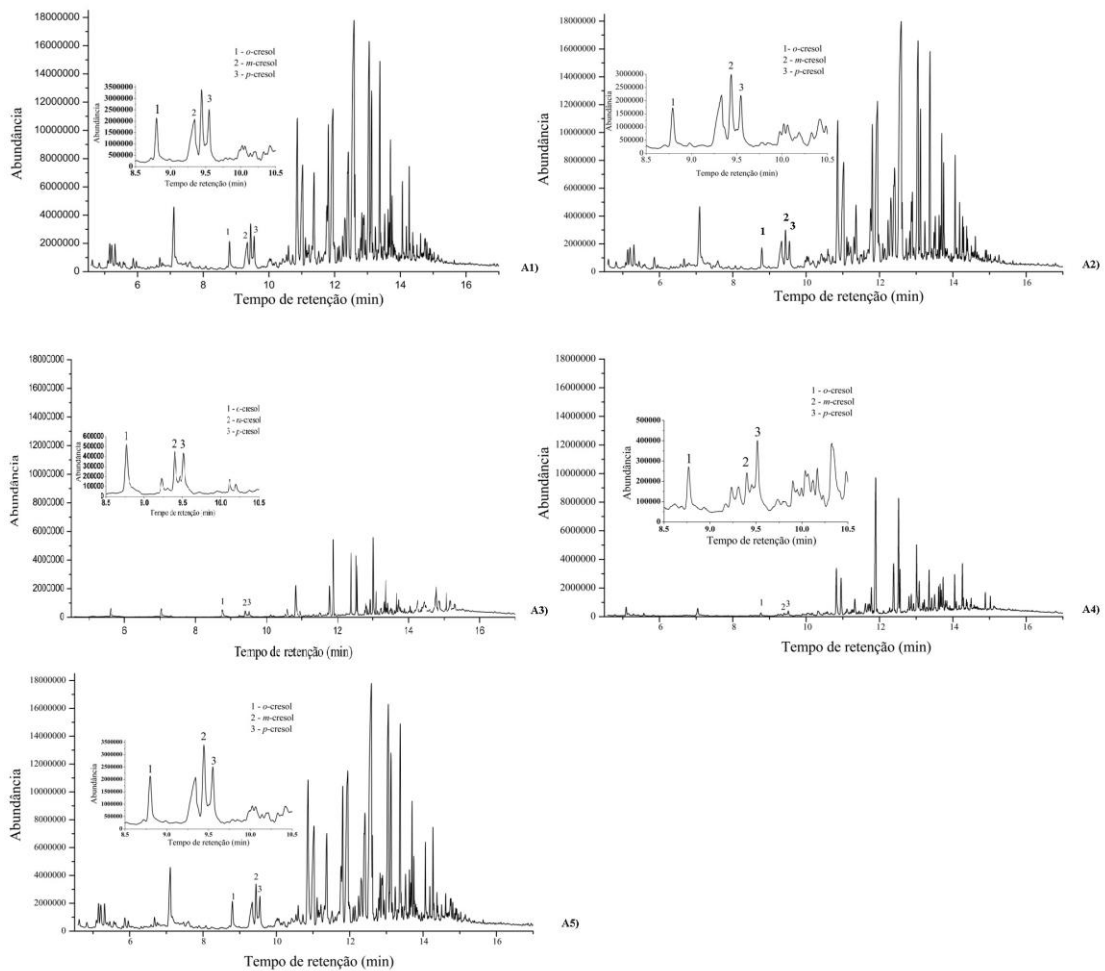
4.8 Teste de Estabilidade

A estabilidade dos cresóis na amostra de fumaça líquida A5, amostra contendo maior concentração de cresóis, foi avaliada em condições ambientes (25 °C) e sob refrigeração (5 °C). Para isso, 4 mL da amostra foram transferidos para *vials* (22 mL), os quais foram deixados sobre a bancada do laboratório ou colocados no refrigerador por 7, 14 e 21 dias. Os experimentos foram realizados em triplicatas. A extração dos cresóis foi realizada por meio da ELL-PBT e os extratos obtidos foram derivatizados e analisados por CG-EM.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeiramente, cinco amostras de fumaça líquida comerciais foram analisadas por CG-EM e os cromatogramas obtidos são apresentados na Figura 2.

Figura 2 – Cromatograma de íons totais das amostras de fumaças líquidas, A1, A2, A3, A4 e A5, respectivamente.



Fonte: Da autora, 2022.

Como pode ser observado, todas as amostras apresentam cresóis na sua composição. Diante da ausência de amostras de fumaça líquida isentas de cresóis, foi necessário usar amostras de água como uma matriz representativa durante a validação da ELL-PBT. Os

cresóis estão presentes nos tempos de retenção do o-cresol (8,75 min), m-cresol (9,40 min) e p-cresol (9,60 min).

5.1 ELL-PBT para cresóis em água

A ELL-PBT tem sido otimizada e validada para a análise de diversos contaminantes químicos em amostras de água (Vieira., 2007). De uma forma geral, a ELL-PBT baseia-se na adição de 8 mL de acetonitrila em 4 mL de água, proporção 2:1. Nessas condições o solvente e a água são totalmente miscíveis, assim, a extração dos cresóis ocorre em meio homogêneo. Com o abaixamento da temperatura em valores inferiores a -18°C , ocorre o rompimento do equilíbrio e, conseqüentemente, a separação da fase orgânica ainda líquida e da água congelada. Os cresóis migram preferencialmente para a acetonitrila, devido à sua baixa solubilidade em água ($21,52 - 25,95\text{ mg L}^{-1}$) e o coeficiente de partição octanol/água (K_{ow}) intermediário ($\text{Log } K_{ow} 1,94 - 1,96$). Vale destacar que a acetonitrila permanece líquida nas condições de extração porque seu ponto de fusão é -45°C .

Na ELL-PBT a mistura água e acetonitrila foi homogeneizada em vórtex para que partículas sólidas, potencialmente presentes nas amostras possam ser dissolvidas ou os cresóis sejam desorvidos da superfície delas e assim aumente a eficiência de extração.

A derivatização dos cresóis presentes nos extratos antes das análises cromatográficas foi necessária para aumentar a volatilidade deles e favorecer à separação dos isômeros *o*-cresol, *m*-cresol e *p*-cresol. (Faludi *et al.*, 2013).

Nas condições ótimas de extração, os cresóis apresentaram porcentagem de recuperação entre 90 e 100% e DPR inferior a 11% em amostras de água.

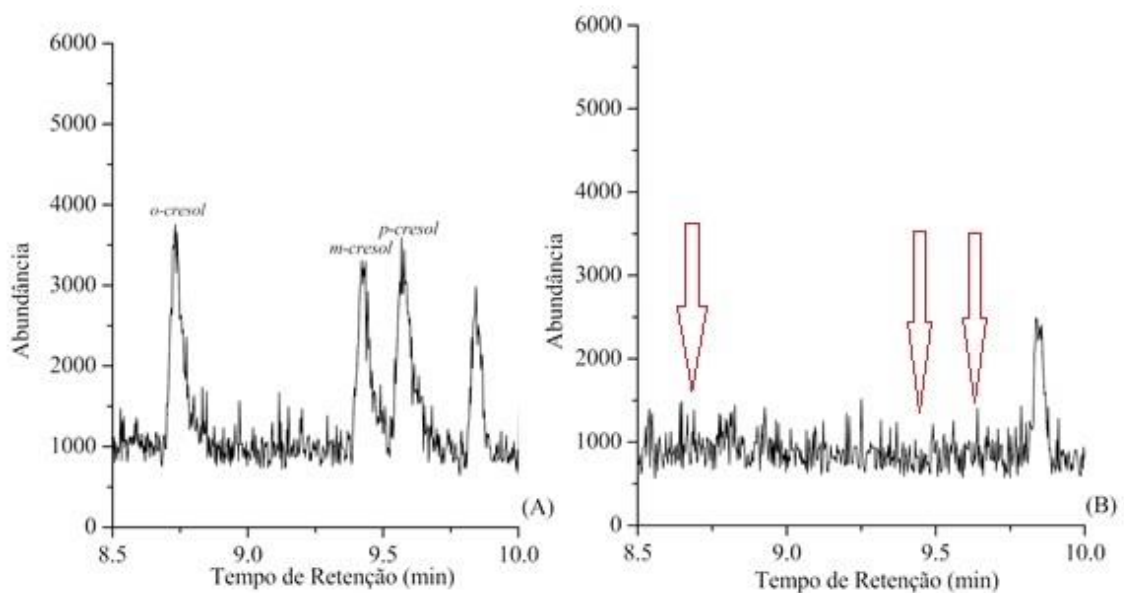
5.2 Validação

Após aplicação do método de extração, a ELL-PBT foi validada em termos de extração de cresóis em água em níveis de mg L^{-1} .

5.2.1 Seletividade

Na Figura 3 são comparados os cromatogramas de íons totais de extratos obtidos a partir da ELL-PBT fortificado com solução padrão de cresóis (2.A) e não fortificados (2.B).

Figura 3 – Cromatogramas de íons totais de extratos obtidos a partir da ELL-PBT. (A) extrato da matriz fortificado com solução padrão de cresóis a $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ (padrão de calibração). (B) extrato não fortificado (branco)



Fonte: Da autora, 2022.

As amostras de água isentas de cresóis não apresentaram interferências nos tempos de retenção do *o*-cresol (8,75 min), *m*-cresol (9,40 min) e *p*-cresol (9,60 min), demonstrando a seletividade do método.

5.2.2 Limite de Quantificação

Na Figura 2 é apresentado o cromatograma de íons totais dos cresóis no LQ, sendo considerada a concentração de 0,5 mg L⁻¹ para os três isômeros de cresol. A metodologia proposta apresentou exatidão e precisão no LQ, como pode ser observado na Tabela 3, conforme exigido pelo SANTE (Comissão Européia, 2019).

Tabela 3 – Dados para LQ, calibração, exatidão e precisão da ELL-PBT de cresóis em amostras de água e análise por CG-EM a partir do cromatograma de íons totais

	Dados de calibração			Recuperação (%) ± DPR		
	LQ (mg L ⁻¹)	Equação	R ²	1 x LQ (n=3)	10 x LQ (n=7)	50 x LQ (n=3)
<i>o</i> -cresol	0,5	$y = 2586x - 233427$	0,9853	100 ± 3	90 ± 9	104 ± 5
<i>m</i> -cresol	0,5	$y = 27062x - 267503$	0,9933	99 ± 2	91 ± 10	97 ± 6
<i>p</i> -cresol	0,5	$y = 274407x - 283518$	0,9893	99 ± 3	91 ± 10	99 ± 7

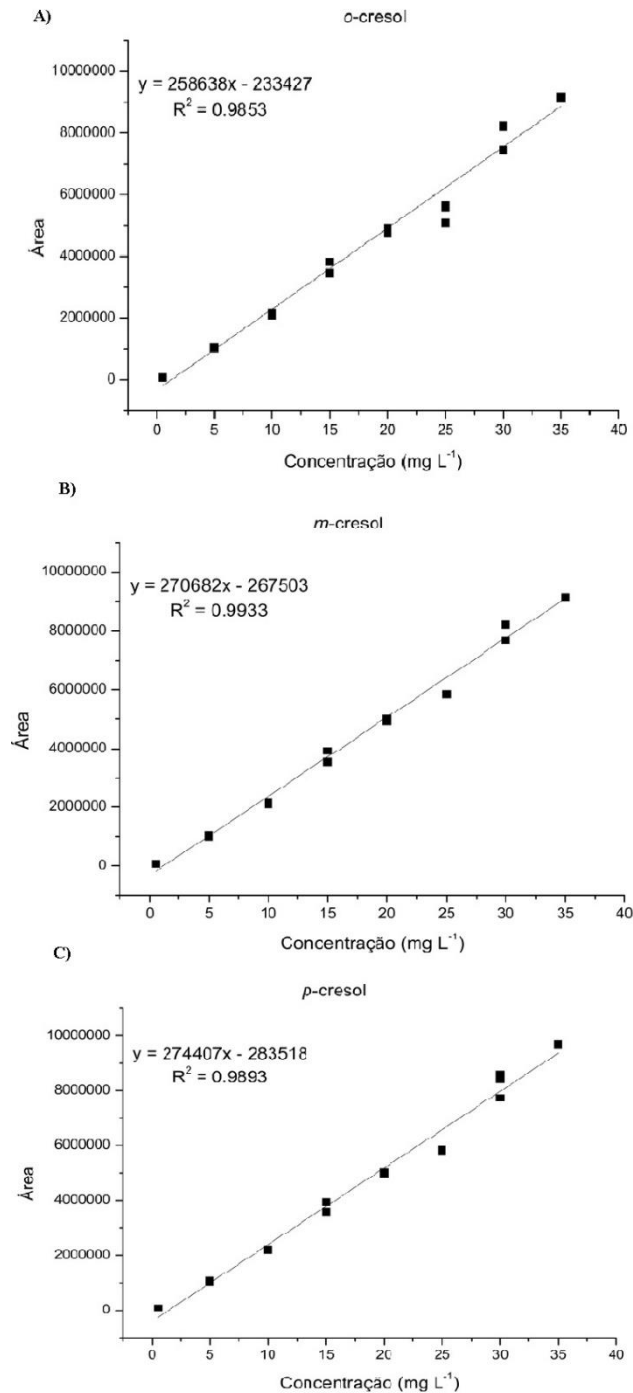
*LQ – limite de quantificação; DPR – desvio padrão relativo.
Fonte: Da autora, 2022.

O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito que pode ser quantificada com exatidão (INMETRO, 2003).

5.2.3 Linearidade

A metodologia proposta mostrou-se linear para os três isômeros dos cresóis na faixa de 0,5 a 35 mg L⁻¹, com coeficiente de determinação (R²) superior a 0,98. Os dados da regressão linear podem ser observados na Figura 4 (A, B e C) para os três cresóis.

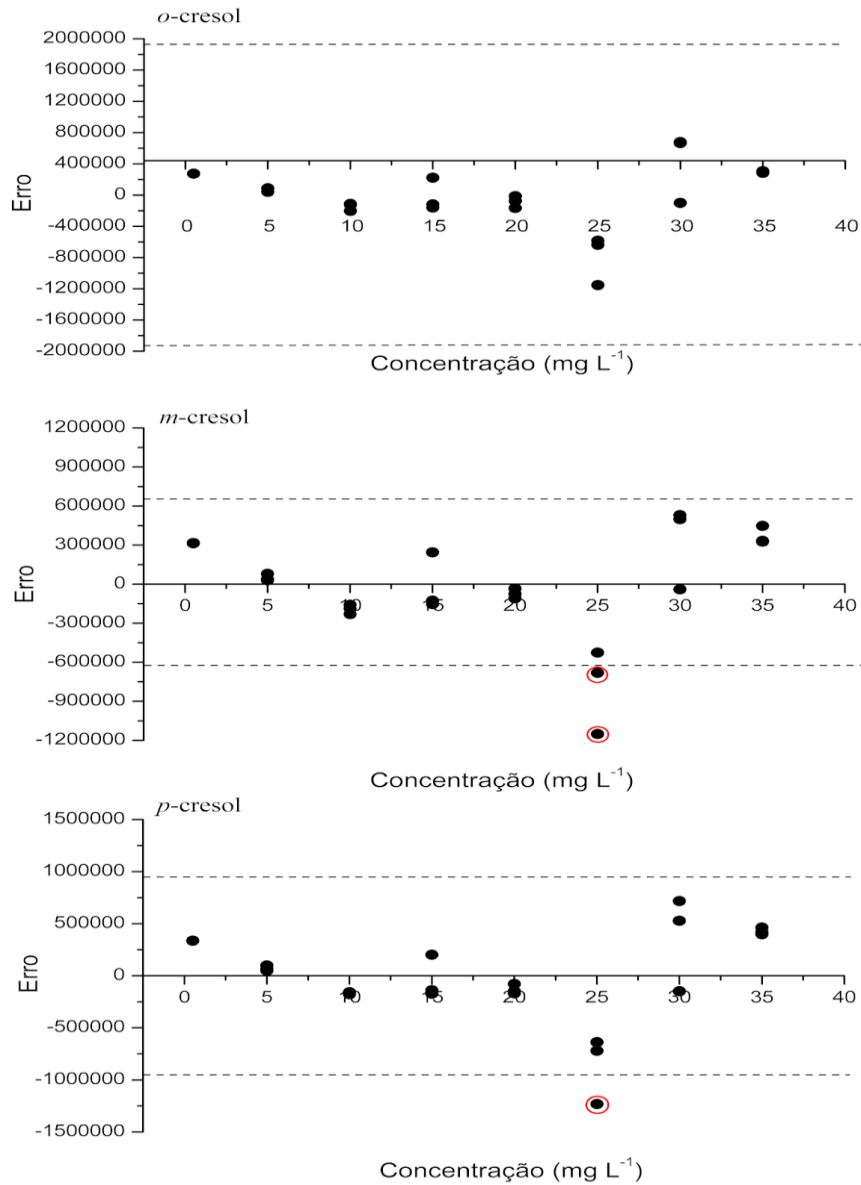
Figura 4 – Dados da calibração obtidos a partir da análise de soluções padrão de cresóis em acetonitrila por CG-EM. A, B e C refere-se ao o-cresol, m-cresol e p-cresol, respectivamente



Fonte: Da autora, 2022.

O ajuste do modelo linear foi avaliado pelo gráfico de resíduos e observou-se que dois pontos do composto *m*-cresol foram eliminados e um ponto do composto *p*-cresol também foi eliminado, pelo Teste de Jackknife, como pode ser observado na Figura 5.

Figura 5 – Gráficos dos resíduos da regressão das curvas analíticas para *o*-cresol, *m*-cresol e *p*-cresol (0,5 a 35 mg L⁻¹) em acetonitrila, com indicação dos respectivos outliers diagnosticados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife, sendo ● = outlier; linha pontilhada = $\pm t_{\text{crit}}(0,95;n-p-1) S_{\text{res}}$



Fonte: Da autora, 2022.

5.2.4 Exatidão e Precisão

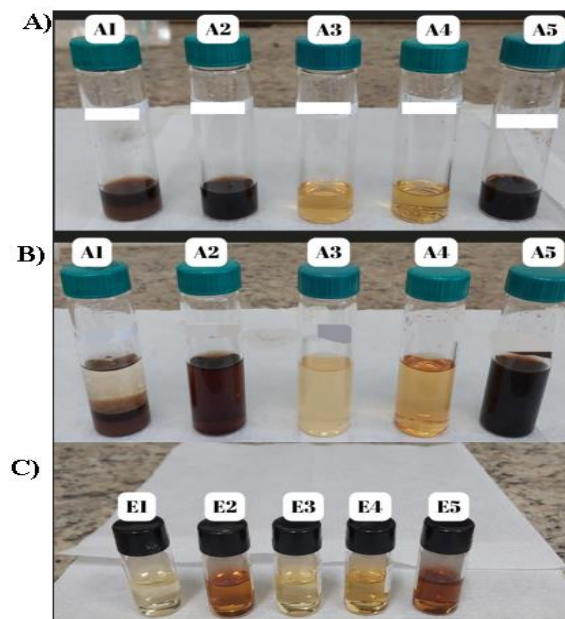
Na Tabela 3 são apresentados os resultados para os experimentos de fortificação/recuperação dos cresóis em três níveis de concentração. A recuperação variou entre 90 e 104% e o DPR foi inferior a 10%. Esses resultados estão de acordo com documento N° SANTE/12682/2019 (Comissão Européia, 2019).

5.3 ELL-PBT de cresóis em fumaça líquida

Como foi observado pelos dados de validação para cresóis em água, a ELL-PBT foi eficiente para extração desses compostos. Os resultados nos sugerem que a ELL-PBT seguida pelas análises por CG-EM pode ser usada eficientemente para quantificar cresóis em amostras de fumaça líquida, a qual é uma amostra essencialmente aquosa, embora apresente centenas de compostos voláteis em sua constituição (Guillen e Ibargoitia, 1999; Guillen e Manzanos, 1999).

Na Figura 6A são apresentadas a imagem das cinco amostras de fumaça líquida antes da ELL-PBT, depois da adição do solvente extrator (acetonitrila) e o extrato final.

Figura 6 – Imagens das amostras de fumaça líquida. A) Antes da ELL-PBT. B) Após adição de acetonitrila. C) Após a ELL-PBT completa



Fonte: Da autora, 2022.

Na Figura 6A pode ser observado que todas as amostras de fumaça líquida diferenciam na intensidade da cor, presença de partículas (A2) e compostos insolúveis (A1). Essas diferenças podem ser atribuídas à origem da madeira, bem como a tecnologia empregada na obtenção da fumaça líquida.

Como pode ser observado na Figura 6B, quando a acetonitrila é adicionada todas as amostras formam fase única, exceto a amostra A1, a qual é produzida artesanalmente usando macieira e pessegueira. Também foi observado que as partículas sólidas presentes na amostra A4 foram totalmente solubilizadas com a adição do solvente orgânico.

Na Figura 6C são mostrados os extratos obtidos após a ELL-PBT. É possível observar que a técnica proposta reduz significativamente pigmentos das amostras.

5.4 Quantificação de cresóis em amostras de fumaça líquida

Os cresóis presentes nos extratos orgânicos de fumaça líquida foram quantificados a partir dos dados de calibração em solvente puro e o método de adição de padrão, com as concentrações para os três cresóis nas cinco amostras que são apresentados na Tabela 4. Nessas condições, a concentração dos cresóis variaram de 3,03 a 38,29 mg L⁻¹. Como pode ser observado, não foi possível quantificar o *m*-cresol na amostra A4, pois no sinal do composto possui um interferente que nos impossibilitou de quantificar a área do mesmo.

Tabela 4 – Concentração dos cresóis em amostras de fumaça líquida (A) determinada a partir da calibração em solvente puro e método de adição de padrão

	Calibração em solvente puro					Método de adição de padrão				
	Concentração (mg L ⁻¹)					Concentração (mg L ⁻¹)				
	A1	A2	A3	A4	A5	A1	A2	A3	A4	A5
<i>o</i> -cresol	3,22	17,71	7,13	4,15	20,06	2,23	15,29	6,09	2,53	50,17
<i>m</i> -cresol	3,51	26,05	5,10	-	38,29	2,46	19,59	2,42	2,66	90,05
<i>p</i> -cresol	3,03	13,21	4,06	3,78	15,56	2,24	12,76	2,09	2,42	49,25

Fonte: Da autora, 2022.

Entretanto, a quantificação de cresóis por meio da curva analítica preparada em solvente puro desconsidera a influência dos componentes da matriz na resposta cromatográfica, denominado de efeito de matriz. Segundo o documento No SANTE/12682/2019 (Comissão Européia, 2019), o método de adição de padrão é uma alternativa quando não há amostras isentas do analito alvo para o preparo das soluções-padrão na matriz. Na Tabela 4, são apresentados os resultados da quantificação de cresóis nas mesmas cinco amostras empregando o método de adição de padrão.

Comparando os resultados das na Tabela 4, podemos observar que a quantificação dos cresóis baseada nos padrões de calibração em solvente puro forneceu uma superestimação das

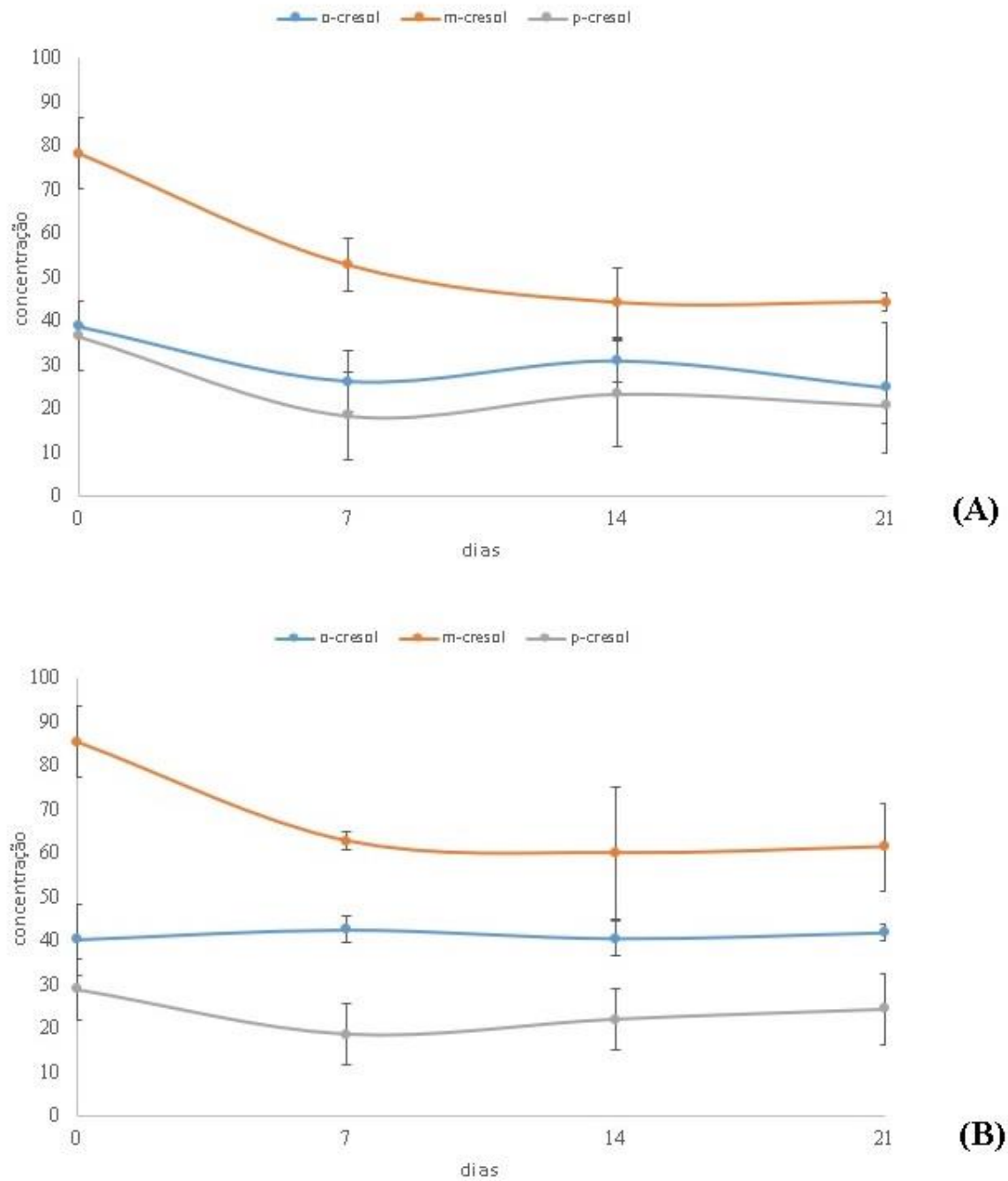
concentrações dos cresóis nas amostras de fumaça líquida A1, A2, A3 e A4. Os valores encontrados por esta estratégia de quantificação foram cerca de 3% a 144% mais elevados do que o método de adição de padrão. Esses dados nos sugerem um efeito de matriz negativo na quantificação de cresóis nessas amostras. Por outro lado, para a amostra A5, a quantificação baseado em solvente puro proporcionou uma subestimação da concentração dos cresóis, pois os valores encontrados nessas condições foram cerca de 60% inferior ao método de adição de padrão. Vale a pena destacar que a amostra A5 era a única que tinha a adição de corante caramelo IV em sua composição, um carboidrato, que são utilizados como proteção/barreira impedindo que os analitos fiquem retidos na coluna cromatográfica (Anastassiades et al., 2003).

Embora o método de adição de padrão seja mais laborioso e oneroso, ele fornece os dados mais próximos das concentrações reais de cresóis em amostras de fumaça líquida, pois considera a influência dos componentes da matriz na análise cromatográfica.

5.5 Teste de Estabilidade

O monitoramento dos três isômeros dos cresóis durante 7, 14 e 21 dias mostrou que as concentrações tendem a ser constantes em ambas as temperaturas, como pode ser observado na Figura 7. Esses resultados podem ser explicados pela ausência de atividade microbiana no meio, pois a fumaça líquida é um efetivo antimicrobiano contra uma variedade de patógenos (Lingbeck *et al.*, 2014). Por outro lado, as amostras refrigeradas apresentaram maiores teores para os isômeros o-cresol e m-cresol em relação às amostras armazenadas em condições ambientes.

Figura 7 – Concentração de cresóis em amostra (A5) de fumaça líquida empregando o Teste de Estabilidade. A) Amostra de fumaça líquida em temperatura ambiente. B) Amostra de fumaça líquida refrigerada.



Fonte: Da autora, 2022.

6 CONCLUSÃO

A ELL-PBT para cresóis em água, seguida pelas análises por CG-EM mostrou-se seletiva, exata e precisa para níveis de concentração em mg L^{-1} . A metodologia proposta foi aplicada com sucesso para a extração dos três isômeros do cresol em amostras de fumaça líquida comercial. A quantificação dos analitos-alvo nessas amostras foi mais adequada pelo método de adição de padrão devido ao efeito de matriz negativo nas análises cromatográficas. Os níveis de cresóis nas amostras comerciais foram muito elevados, na faixa de 2,09 a 90,05 mg L^{-1} . Outra conclusão importante é que os níveis de cresóis tendem a permanecer constantes nas amostras de fumaça líquida por três semanas tanto em ambiente refrigerado quanto em condições ambiente.

REFERÊNCIAS

- Abdel-Shafy, H.I., Mansour, M.S.M. 2015. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egypt J Pet.* 25: 107–123. doi:10.1016/j.ejpe.2015.03.011.
- Anastassiades, M.; Mastovská, K.; Lehotay, S.J. 2003. Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides. *Journal of Chromatography A.* 1015: 163-184.
- [ANVISA] Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003.
- Andrade, P.D., Silva, J.L.G, Caldas, E.D. 2013. Simultaneous analysis of aflatoxins B1, B2, G1, G2, M1 and ochratoxin-A in breast milk by high-performance liquid chromatography/fluorescence after liquid–liquid extraction with low temperature purification (LLE–LTP). *J. Chromatogr. A*, 1304: 61-68
- Andriamihaja, M., Lan, A., Beaumont, M., Audebert, M., Wong, X., Yamada, K., Yin, Y., Tomé, D., Carrasco-Pozo, C., Gotteland, M., Kong, X., Blachier, F. 2015. The deleterious metabolic and genotoxic effects of the bacterial metabolite p-cresol on colonic epithelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 85:219-227.
- Araújo, E.A.; Lara, M.C.R.; Reis, M.D.; Viriato, R.L.S.; Rocha, R.A.R.; Gonçalves, R.G.L.; Heleno, F.F.; Queiroz, M.D.; Toronto, J.; Pinto, F.G. 2016. Determination of Haloxypop-Methyl, Linuron, and Procymide Pesticides in Carrot Using SLE-LTP Extraction and GC-MS. *Food Anal. Methods* 2016, 9, 1344-1352. DOI: 10.1007/s12161-015-0315-3.
- Arevalo, R.; Ni, Z.; Danell, R.M. 2020. Mass spectrometry and planetary exploration: a brief review and future projection. *J. Mass Spectrom.*, 55(1).
- [ATSDR] Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2021. Substance priority list. [Acessado em abril de 2023]. <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html>.
- Bader, M. 1980. *J. Chem. Educ.*, 57, p. 703.
- Bai, Y.; Yan, L.; Li, G.; Zhao, R.; Li, F. 2014. Effects of Demineralization on Phenols Distribution and Formation During coal Pyrolysis. *Fuel* 2014, 134, 368–374. DOI: 10.1016/j.fuel.2014.05.076.
- Berg, R.G.; Murta, A.L. M.; Kugler, W. 1988. *Quim. Nova* 11, p. 288.
- Bosch-Reig, F.; Campins-Falco, P. 1990. *Analyst* 115, p. 111.
- Cadwallader, K.R. 2007. Wood smoke flavor. In: Nolle LML, editor. *Handbook of meat, poultry and seafood quality*. Oxford (UK): Blackwell Publishing; p. 705.

[CONAMA] National Council for the Environment. 2006. Resolution no 375/2006. Defines criteria and procedures for the agricultural use of sewage sludge generated in sewage treatment plants and their derivate products, and makes other provisions.

[EPA] U.S. Environmental Protection Agency. 1999. Integrated Risk Information System (IRIS) on 3-methylphenol. National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, Washington, DC.

[EC] European Commission. 2019. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Document N° SANTE/12682/2019.

Faludi, T.; Andrási, N.; Vasanits-Zsigrai, A.; Záaray, G.; Molnár-Perl, I. 2013. Systematic Derivatization, Mass Fragmentation and Acquisition Studies in the Analysis of Chlorophenols, as Their Silyl Derivatives by Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A*. 1302: 133–142. DOI: 10.1016/j.chroma.06.004.

[FSAI] Food Safety Authority of Ireland. 2015. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in foods. Dublin (Ireland): Food Safety Authority of Ireland. Toxicology factsheet series, p. 2.

Fellows, P.J. 2007. Smoking, in: *Food Process. Technol.*, Elsevier, 717–732. [Acessado em março de 2023]. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100522-4.00015-8>.

Goulart, S.M. Queiroz, M.E.L.R. Neves, A.A. Queiroz, J.H. 2008. *Talanta* 75(5): 1320–1323.

Gonzalez, F.J.E.; Torres, M.E.H.; Lopez, E. A.; Cuadrosrodriguez, L.; Vidala, J. L. M. 2002. Matrix-effects of vegetable commodities in electron-capture detection applied to pesticide multiresidue analysis, *Journal of Chromatography A*. 966: 155-165.

Guillen, M.D. e Ibargoitia, M.L. 1999. GC/MS analysis of lignin monomers, dimers and trimers in liquid smoke flavourings. *J Sci Food Agric* 79: 1889-1903.

Guillen, M.D., Manzanos MJ. 1999. Smoke and liquid smoke. Study of an aqueous smoke flavouring from the aromatic plant *Thymus vulgaris* L. *J Sci Food Agric* 79: 1267-1274.

Hajslová, J.; Holadova, K; Kocourek, V.; Poutska, J.; Godula, M.; Cuhra, P.; Kempny, M. J. 1998. *Chromatogr., A*, 800: 283.

Hajslová, J.; Zrostliková, J. 2003. Matrix effects in (ultra) trace analysis of pesticide residues in food biotic matrices, *Journal of Chromatography A*. 1000: 181-197.

Hidi, I.J.; Jahn, M.; Weber, K.; Bocklitz, T.; Pletz, M.W.; Cialla-May, D.; Popp, J. 2016. Lab-on-a-Chip-Surface Enhanced Raman scattering combined with the standard addition method: toward the quantification of nitroxoline in spiked human urine samples. *Anal Chem*. 88: 9173-9180.

[ICH] International Conference on Harmonisation. 2022. Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2(R2) (EMA/CHMP/ICH/82072/2006).

[INMETRO] Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. 2003. Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008.

[IPCS] International Programme on Chemical Safety. 1995. Environmental Health Criteria 168: Cresols. World Health Organization, Geneva, Switzerland

Knockaert, C. 2002. Le fumage Du Poisson, 7ème édition, IFREMER, Centre de Brest-France.

Kostyra, E., Baryłko-Pikielna, N. 2006. Volatiles composition and flavour profile identity of smoke flavourings. *Food Qual Prefer.* 17: 85-95.

Levey, A.S., Atkins, R., Coresh, J., Cohen, E.P., Collins, A.J., Eckardt, K.U., Nahas, M.E., Jaber, B.L., Jadoul, M., Levin, A. *et al.* 2007. Chronic kidney disease as a global public health problem: Approaches and initiatives – a position statement from Kidney Disease Improving Global Outcomes. *Kidney Int.* 72: 247-259.

Liu, W., Tomino, Y., Lu, K. 2018. Impacts of indoxyl sulfate and p-cresol sulfate on chronic kidney disease and mitigating effects of AST-120. *Toxins.* 10: 367-389.

Lingbeck, J.M.; Cordero, P.; O'Bryan, C.A.; Johnson, M.G.; Ricke, S.C. 2014. Functionally of liquid smoke as an all-natural antimicrobial in food preservation. *Meat Sci.* 2014 Jun; 97(2), 197-206. [https://doi: 10.1016/j.meatsci.2014.02.003](https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.02.003)

Lustre, A.O., Issenberg, P. 1970. Phenolic Components of Smoked Meat Products. *J. Agr. Food Chem.* 18(6): 1056–1060

Marilley L., Casey, M.G. 2004. Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *Int. J. Food Microbiol.* 90: 139- 159.

Martin, E.M., O'Bryan, C.A., Lary, R.Y. Jr., Griffis, C.L., Vaughn, K.L., Marcy, J.A., Ricke, S.C., and Crandall, P.G. 2010. Spray application of liquid smoke to reduce or eliminate *Listeria monocytogenes* surface inoculated on frankfurters. *Meat Sci.* 85: 640–644.

Mcsweeney, PLH, Sousa, M.J. 2000. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Lait* 80: 293–324.

Milly, P.J., Toledo, R.T., and Ramakrishnan, S. 2005. Determination of minimum inhibitory concentrations of liquid smoke fractions. *J. Food Sci.*, 70: M12–M17.

Montazeri, N., Oliveira, A.C., Himelbloom, B.H., Leigh, M.B., Crapo, C.A. 2013. Chemical characterization of commercial liquid smoke products. *Food Sci. Nutr.*, 1: 102– 115.

Myasein, F.; Kim, E.; Zhang, J.; Wu, H.; El-Shourbagy, T. A. 2009. *Anal. Chim. Acta.* 651: 112.

- O'Keefe, S.J.D. 2016. Diet, microorganisms and their metabolites, and colon cancer. *Nat Rev Gastro Hepat.* 13: 691-706.
- Ojeda, M., Bárcenas P., Pérez-Elortondo, F.J., Albisu M, Guillén MD. 2002. Chemical references in sensory analysis of smoke flavourings. *Food Chem.* 78: 433-442.
- Olmos, A.; Olguin, P.; Fajardo, C.; Razo, E.; Monroy, O. 2004. Physicochemical Characterization of Spent Caustic from the OXIMER Process and Sour Waters from Mexican Oil Refineries. *Energy Fuels* 2004, 18, 302–304. DOI: 10.1021/ef030053c.
- Oshiro, S., Silvério, F., Pinho, G. 2022. Determination of p-cresol levels in smoked meat products using QuEChERS method and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Environ. Sci. Health B.* 57(10): 796-803.
- Persico, A.M., Napolioni, V. 2012. Urinary p-cresol in autism spectrum disorder. *Neurotoxicol Teratol.* 36: 82-90.
- Pinho, G. P. 2007. Extração de pesticidas em amostras de tomate pelas técnicas de: extração sólido-líquido e purificação em baixa temperatura (ESL-PBT) e dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) para análise em cromatografia gasosa. 98p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Pinho, G.P., Neves, A.A., Queiroz, M.E.L.R., Silvério, F.O. 2010. Optimization of the liquid–liquid extraction method and low temperature purification (LLE–LTP) for pesticide residue analysis in honey samples by gas chromatography. *Food Control* 21: 1307–1311.
- Pinho, G.P.; Neves, A.A.; Queiroz, M. E. L. R.; Silvério, F. O. 2010. *Food Control.* 21: 1307.
- Pozzebon, J.M.; Vilegas, W.; Jardim, I. C. S. F. 2003. *J. Chromatogr. A.* 987, 375.
- Ramakrishnan, S., Moeller, P. 2002. Liquid smoke: product of hardwood pyrolysis. *Fuel Chem Div Prepr.* 47(1):366.
- Rong, Y., Kiang, T.K.L. 2020. Characterizations of Human UDP-Glucuronosyltransferase Enzymes in the Conjugation of p-Cresol. *Toxicol. Sci.* 176(2): 285-296.
- Rübensam, G., Barreto, F., Hoff, R.B., Kist, T.L., Pizzolato, T.M. 2011. A liquid–liquid extraction procedure followed by a low temperature purification step for the analysis of macrocyclic lactones in milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry and fluorescence detection. *Anal. Chim. Acta* 705:24- 29.
- Saito, Y., Sato, T., Nomoto, K., Tsuji, H. 2018. Identification of phenol and p-cresol producing intestinal bacteria by using media supplemented with tyrosine and its metabolites. *FEMS Microbiol Ecol.* 94:1-11.
- Schubring, R. 2008. Use of “filtered smoke” and carbon monoxide with fish. *J. Cons. Prot. Food Safety*, 3, 31–44.

Šimko, P. 2005. Factors affecting elimination of polycyclic aromatic hydrocarbons from smoked meat foods and liquid smoke favorings. *Mol Nutr Food Res* 49:637–647. [Acessado em abril de 2023]. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200400091>

Simon, R., De la Calle, B., Palme, S., Meier, D., Anklam, E. 2005. Composition and analysis of liquid smoke flavouring primary products. *J. Sep. Sci.* 28: 871-882.

Snyder, L.R.; Kirkland, J.J.; Glajch, J.L. 1997. *Practical HPLC Method Development*, 2nd edition, Wiley: New York. cap. 15.

Swartz, M.E.; Krull, I.S. 1998. *Pharm. Technol.* 2 (12).

Thompson, M.; Ellisson, S. L. R.; Wood, R. 2002. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. *IUPAC, Pure and Applied Chemistry*, v. 74, p. 835–855.

Varlet, V., Serot, T., and Prost, C. 2010. Smoke flavoring technology in seafood In ‘‘Handbook of Seafood and Seafood Products Analysis,’’ ed. by L.M.L. Nollet and F. Toldra. CRC Press, Boca Raton, pp. 233–254.

Vieira, H.P.; Neves, A.A.; Queiroz, M.E.L.R. 2007. *Quim. Nova* 30 (3): 535–540

[WHO] World Health Organization. 1996. International Programme on Chemical Safety, United Nations Environment Programme & International Labour Organization. *Cresols: health and safety guide*. [Acessado em abril de 2023]. <http://www.who.int/iris/handle/10665/38142>

Yabiku, H.Y., Martins, M.S., Takahashi, M.Y. 1993. Levels of benzo [a] pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid smoke flavour and some smoked foods. *Food Addit Contam* 10:399–405. [Acessado em abril de 2023]. <https://doi.org/10.1080/02652039309374163>