

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Leila Rodrigues Caldeira

DETERMINAÇÃO DE ÁLCOOIS TÓXICOS EM ALIMENTOS E MEDICAMENTOS
EMPREGANDO CROMATOGRAFIA A GÁS ACOPLADA À ESPECTROMETRIA
DE MASSAS

Belo Horizonte – MG

2024

Leila Rodrigues Caldeira

**DETERMINAÇÃO DE ÁLCOOIS TÓXICOS EM ALIMENTOS E
MEDICAMENTOS EMPREGANDO CROMATOGRAFIA A GÁS ACOPLADA
À ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Christian Fernandes (Faculdade de Farmácia - UFMG)

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Mathias Orlando (Instituto de Ciências Exatas – UFMG)

Belo Horizonte – MG

2024

C146d Caldeira, Leila Rodrigues.
Determinação de álcoois tóxicos em alimentos e medicamentos empregando cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas [recurso eletrônico] / Leila Rodrigues Caldeira. – 2024.
1 recurso eletrônico (184 f. : il.) : pdf

Orientador: Christian Fernandes.
Coorientador: Ricardo Mathias Orlando.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências de Farmacêuticas.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Segurança alimentar – Teses. 2. Etilenoglicol – Teses. 3. Metanol – Teses. 4. Cerveja – Teses. 5. Glicerina – Teses. 6. Propilenoglicol – Teses. 7. Antitussígenos – Teses. 8. Medicamentos – Teses. 9. Contaminantes químicos – Teses. I. Fernandes, Christian. II. Orlando, Ricardo Mathias. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 615.4



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

“DETERMINAÇÃO DE ÁLCOOIS TÓXICOS EM ALIMENTOS E MEDICAMENTOS EMPREGANDO CROMATOGRAFIA A GÁS ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS”

LEILA RODRIGUES CALDEIRA

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Doutora em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Dra. Michele Fabiane de Oliveira
Laboratório Federal de Defesa Agropecuário - LFDA/MG

Prof. Dr. Bruno Gonçalves Botelho
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Profa. Dra. Renata Pereira Lopes Moreira
Universidade Federal de Viçosa - UFV

Prof. Dr. José Eduardo Gonçalves
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. Christian Fernandes - Orientador
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. Ricardo Mathias Orlando - Coorientador
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 24 de novembro de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Christian Fernandes, Professor do Magistério Superior**, em 24/11/2023, às 17:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jose Eduardo Goncalves, Professor do Magistério Superior**, em 24/11/2023, às 17:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Renata Pereira Lopes Moreira, Usuário Externo**, em 26/11/2023, às 20:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Michele Fabiane de Oliveira, Usuária Externa**, em 30/11/2023, às 08:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Goncalves Botelho, Professor do Magistério Superior**, em 20/12/2023, às 18:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Mathias Orlando, Professor do Magistério Superior**, em 21/12/2023, às 13:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2828095** e o código CRC **44A06EA5**.

Dedico este trabalho a todas as vítimas da intoxicação por etilenoglicol e dietilenoglicol do episódio de contaminação de cervejas no Brasil em 2020 e a seus familiares. Graças à ciência, foi possível a elucidação deste caso.

“Não sabendo que era impossível, foi lá e fez.”

Jean Cocteau

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pois tudo ocorre em minha vida é porque Ele permite.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Christian Fernandes, que acompanhou toda a trajetória da minha tese. Agradeço por ter aceitado ser orientador deste trabalho e pela confiança em mim depositada. Enfrentamos diversos desafios ao longo desses cinco anos, envolvendo a eclosão de uma pandemia que dificultou a realização de trabalhos experimentais, mudança da base física do laboratório em que eu exercia minhas atividades, necessidade de aguardar manutenção corretiva em equipamentos e alteração do projeto inicial, entre outros fatores, que poderiam ter me feito desistir se não fosse o seu apoio e incentivo. Agradeço pelos ensinamentos, por toda a compreensão e gentileza ao longo destes anos.

Agradeço ao coorientador Prof. Dr. Ricardo Mathias Orlando, que participou da banca de qualificação e trouxe colaborações muito valiosas ao trabalho.

Agradeço a todos os professores das disciplinas que cursei para o Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pelos ensinamentos, e a todos os funcionários da Faculdade de Farmácia, que propiciam a continuidade de nossos trabalhos. Agradeço aos professores e colegas do Laboratório de Controle de Qualidade da Fafar, pelo companheirismo e auxílio, em especial aos colegas Naialy e Matheus, que sempre me deram suporte quando eu precisava usar a infraestrutura do Cedafar, com toda a gentileza.

Agradeço também aos colegas do Lacqsa e do LFDA, que me auxiliaram na condução dos trabalhos e pelo convívio diário. Agradeço em especial à Thalita e ao Fernando, pela parceria de sempre e pelo incentivo.

Agradeço aos meus familiares, que são minha base de vida, em especial aos meus pais, que sempre incentivaram meus estudos e minha formação, e ao meu marido Luiz, pelo incentivo e por sempre acreditar em mim. Agradeço também aos amigos que torceram por mim.

Esse trabalho representa uma construção desafiadora, que dependeu de meu esforço, mas jamais seria possível sem toda essa base de apoio.

RESUMO

O desenvolvimento e a validação de métodos analíticos empregando técnicas adequadas são cruciais para assegurar a qualidade e a segurança de insumos farmacêuticos e alimentares, medicamentos e alimentos. Contaminantes desses produtos, como etilenoglicol, dietilenoglicol e metanol, apresentam elevada toxicidade em humanos quando ingeridos. Foram localizados apenas cinco estudos em bases de dados científicas de métodos analíticos para dietilenoglicol em alimentos, sendo que apenas um empregou a técnica de GC-MS e nenhum preconizou a quantificação simultânea de etilenoglicol e dietilenoglicol. Embora existam alguns estudos para determinação simultânea de etilenoglicol e dietilenoglicol em glicerina e propilenoglicol por GC-FID, não foram localizados métodos multianalitos na literatura para etilenoglicol, dietilenoglicol e metanol em glicerina, propilenoglicol e xaropes por GC-MS, técnica mais seletiva e de maior detectabilidade. Buscando superar as limitações dos métodos analíticos existentes na literatura, no presente trabalho foram desenvolvidos e validados métodos multianalitos empregando preparo de amostra por simples diluição e quantificação por GC-MS, com ionização por impacto eletrônico, na análise de contaminantes (etilenoglicol e dietilenoglicol em cervejas; etilenoglicol, dietilenoglicol e metanol em glicerina, propilenoglicol e xaropes farmacêuticos). Todas as figuras de mérito foram atendidas na validação. Os métodos demonstraram ser seletivos. As regressões lineares das curvas de calibração foram estatisticamente significativas e o valor mínimo para os coeficientes de correlação foi de 0,990. Os métodos apresentaram exatidão e precisão satisfatórias para todas as concentrações avaliadas de todos os analitos. Os limites de detecção e de quantificação foram considerados apropriados para a finalidade da análise. Foi desenvolvido um modelo para estimativa da incerteza de medição, sendo que a incerteza expandida percentual para amostras fortificadas em concentração equivalente ao limite de quantificação esteve em torno de 30% e os principais fatores que contribuíram para a incerteza foram a não correção do resultado pela recuperação e a precisão intermediária. O método de análise na cerveja possibilitou a elucidação de uma ação de fiscalização real, sendo possível detectar e/ou quantificar a presença de etilenoglicol e dietilenoglicol em 51 amostras de cerveja, provenientes de apenas um fabricante, entre 701 amostras analisadas, o que permitiu a retirada de mais de 80 mil litros de cerveja contaminada no Brasil. Por fim, detectou-se a presença de etilenoglicol e dietilenoglicol em níveis inferiores ao limite de quantificação do método em uma amostra de medicamento, indicado para uso adulto e pediátrico, entre 36 amostras de xaropes farmacêuticos, soluções, suspensões e emulsões orais analisadas. Este achado evidencia a importância da implementação de análises de controle de qualidade de glicerina e propilenoglicol para a busca de álcoois tóxicos.

Palavras-chave: Segurança alimentar; etilenoglicol; dietilenoglicol; metanol; cerveja; glicerina; propilenoglicol; xarope; medicamentos; contaminantes.

ABSTRACT

The development and validation of analytical methods employing adequate techniques are crucial to obtain information related to the quality of medicine and food, aiming to guarantee the safety of their consumption. Compounds of the ethylene glycol class, such as ethylene glycol and diethylene glycol, and other toxic alcohols like methanol, have high toxicity in humans when ingested. Only five studies of analytical methods for diethylene glycol in foods were found in scientific databases, and only one of them used the GC-MS technique and none applied the simultaneous quantification of ethylene glycol and diethylene glycol. Although there are some studies for the simultaneous determination of ethylene glycol and diethylene glycol in glycerin and propylene glycol by GC-FID, multianalyte methods were not found in the literature for ethylene glycol, diethylene glycol and methanol in glycerin, propylene glycol and syrups by GC-MS, a more selective technique with greater detectability. Aiming to overcome the limitations of analytical methods described in the literature, in the present work multianalyte methods were developed and validated using simple dilution of the sample and quantification by GC-MS, with electronic impact ionization, in the analysis of contaminants (ethylene glycol and diethylene glycol in beers; ethylene glycol, diethylene glycol and methanol in glycerin, propylene glycol and pharmaceutical syrups). All figures of merit were met in validation. The methods proved to be selective. The linear regressions of the calibration curves were statistically significant, with the minimum value for the correlation coefficients being 0.990. The methods showed satisfactory accuracy and precision at all concentration levels analyzed for all analytes. The limits of and quantification were considered appropriate for the purpose of the analysis. An uncertainty model was developed. It was found that the percentual expanded uncertainty in samples fortified in the concentration of limit of quantitation was at about 30% and the main contributions to the uncertainty of the result was the absence of correction of the results by analyte recovery and the intermediate precision. The method for beer analysis, employed in a real inspection action, detect and/or quantify the presence of ethylene glycol and diethylene glycol in 51 beer samples, coming from just one manufacturer, among 701 samples analyzed, which allowed the removal of more than 80 thousand liters of contaminated beer in Brazil. Finally, the presence of ethylene glycol and diethylene glycol was detected at levels below the method's quantification limit in a sample of an oral solution, indicated for adult and pediatric use, among 36 samples of pharmaceutical syrups, solutions, suspensions and oral emulsions analyzed. This finding highlights the importance of implementing quality control analyzes of glycerin and propylene glycol to search for toxic alcohols.

Keywords: Food safety; ethylene glycol; diethylene glycol; methanol; beer; glycerin; propylene glycol; syrup; pharmaceuticals; contaminants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Via metabólica do EG	26
Figura 2 - Via metabólica do DEG	27
Figura 3 - Via metabólica do MeOH	28
Figura 4 - Produtos obtidos da hidrogenólise catalítica do glicerol.....	31
Figura 5 - Diagrama de Ishikawa para determinação das fontes de incerteza do método analítico de determinação da concentração de EG, DEG e MeOH nas diversas matrizes.....	70
Figura 6 – Cromatograma de solução padrão de EG 100 mg L ⁻¹ em etanol.....	77
Figura 7 – Cromatograma de solução padrão de DEG 100 mg L ⁻¹ em etanol.....	77
Figura 8 – Cromatograma de solução padrão de MeOH 20 mg L ⁻¹ em etanol.....	78
Figura 9 – Espectro de massas (intensidade de íons <i>versus</i> <i>m/z</i>) de solução padrão de EG 100 mg L ⁻¹ , seguido do espectro de massas de EG em biblioteca de GC-MS obtido por análise de similaridade estrutural.....	79
Figura 10 – Espectro de massas (intensidade de íons <i>versus</i> <i>m/z</i>) de solução padrão de DEG 100 mg L ⁻¹ , seguido do espectro de massas de EG em biblioteca de GC-MS obtido por análise de similaridade estrutural.....	80
Figura 11 – Espectro de massas (intensidade de íons <i>versus</i> <i>m/z</i>) de solução padrão de MeOH 20 mg L ⁻¹ , seguido do espectro de massas de EG em biblioteca de GC-MS obtido por análise de similaridade estrutural.....	81
Figura 12 – Espectro de massas de EG na biblioteca NIST.....	82
Figura 13 – Espectro de massas de DEG na biblioteca NIST.....	83
Figura 14 – Espectro de massas de MeOH na biblioteca NIST.....	84
Figura 15 – Cromatograma de cerveja (abundância de íon <i>versus</i> tempo) fortificada com os analitos EG, DEG e PI em concentração 10 mg L ⁻¹	85

Figura 16 – Cromatograma de GLI (abundância de íon <i>versus</i> tempo) 5.000 mg.L ⁻¹ fortificado com os analitos EG, DEG, MeOH e PI em concentração 10 mg L ⁻¹	86
Figura 17 – Cromatograma de PPG (abundância de íon <i>versus</i> tempo) 5.000 mg L ⁻¹ fortificado com os analitos EG, DEG, MeOH e PI em concentração 10 mg L ⁻¹	87
Figura 18 – Cromatograma de xarope (abundância de íon <i>versus</i> tempo) fortificado a 10 mg L ⁻¹ com EG, DEG, MeOH e PI.....	88
Figura 19 - Cromatograma (abundância de íons <i>versus</i> tempo) obtido no modo SIM para solução de EG 100 mg L ⁻¹ (TIC e EIC).....	97
Figura 20 - Cromatograma (abundância de íons <i>versus</i> tempo) obtido no modo SIM para solução de DEG 100 mg L ⁻¹ (TIC e EIC).....	98
Figura 21 - Cromatograma (abundância de íons <i>versus</i> tempo) obtido no modo SIM para o solvente etanol (TIC e EIC).....	99
Figura 22 – Destaque para <i>m/z</i> específicos dos cromatogramas (abundância de íons <i>versus</i> tempo) obtidos no modo SIM para solução de EG 100 mg L ⁻¹ - <i>m/z</i> 43, 61 e 31, nesta ordem, seguido da demonstração da ausência de picos interferentes no TR de DEG - <i>m/z</i> 75 e 45, nesta ordem.....	100
Figura 23 – Destaque para <i>m/z</i> específicos dos cromatogramas (abundância de íons <i>versus</i> tempo) obtidos no modo SIM para solução de DEG 100 mg L ⁻¹ - <i>m/z</i> 75 e 45, nesta ordem, seguido da demonstração da ausência de picos interferentes no TR de EG - <i>m/z</i> 43, 61 e 31, nesta ordem.....	100
Figura 24 - Cromatograma (abundância de íons <i>versus</i> tempo) obtido no modo SIM para a ST de 1,4-BuOH 10 mg L ⁻¹	101
Figura 25 - Cromatogramas (abundância de íons <i>versus</i> tempo) de amostra branca (20BEB0263) e a busca por íons característicos dos analitos. 1ª linha: EG <i>m/z</i> 43, 61 e 31 (TR 5,6). 2ª linha: DEG <i>m/z</i> 75 e 45 (TR 9,2). 3ª linha: 1,4-BuOH <i>m/z</i> 44, 57 e 71 (TR 8,7).....	102
Figura 26 – Cromatograma de íon totais de amostra branca (em preto) e amostra branca fortificada com EG, DEG e PPG 15 mg.L ⁻¹ e com o padrão interno na concentração usual do método (em vermelho).....	104

Figura 27 – Pesquisa de íons interferentes no solvente etanol - m/z específicos e no TR de MeOH, EG, PI e DEG, nesta ordem.....	106
Figura 28 – Comprovação de pureza da solução de EG 20 mg L ⁻¹ pela pesquisa dos valores de m/z específicos e no TR de MeOH, EG, PI e DEG.....	106
Figura 29 - Comprovação de pureza da solução de DEG 20 mg L ⁻¹ pela pesquisa dos valores de m/z específicos e no TR de MeOH, EG, PI e DEG.....	107
Figura 30 - Comprovação de pureza da solução de MeOH 20 mg L ⁻¹ pela pesquisa dos valores de m/z específicos e no TR de MeOH, EG, PI e DEG.....	108
Figura 31 - Comprovação de pureza da solução do PI 10 mg L ⁻¹ pela pesquisa dos valores de m/z específicos e no TR de MeOH, EG, PI e DEG.....	109
Figura 32 – Pesquisa de picos interferentes em solução de GLI 5.000 mg L ⁻¹ - m/z específicos e no TR de MeOH, EG, PI e DEG, nesta ordem..	110
Figura 33 – Pesquisa de picos interferentes em solução de PPG 5.000 mg L ⁻¹ - m/z específicos e no TR de MeOH, EG, PI e DEG, nesta ordem..	110
Figura 34 – Pesquisa de picos interferentes em solução de xarope branco - m/z específicos e no TR de MeOH, EG, PI e DEG, nesta ordem.	111
Figura 35 – CCEMBF independentes (n=3), na matriz cerveja, obtidas pelo MMQO, construídas pelas médias de leituras das triplicatas das respostas instrumentais para EG (m/z 61), seguido do respectivo gráfico de resíduos.....	121
Figura 36 - CCEMBF independentes (n=3), na matriz cerveja, obtidas pelo MMQO, construídas pelas médias de leituras das triplicatas das respostas instrumentais para DEG (m/z 75), seguido do respectivo gráfico de resíduos.....	121
Figura 37 – CCAS independentes (n=3), para análise de glicerina, obtidas pelo MMQO, construídas pelas médias de leituras das triplicatas das respostas instrumentais para EG (m/z 61), seguido do respectivo gráfico de resíduos.....	122

Figura 38 – CCAS independentes (n=3), para análise de xarope, obtidas pelo MMQO, construídas pelas médias de leituras das triplicatas das respostas instrumentais para EG (<i>m/z</i> 31), seguido do respectivo gráfico de resíduos.....	122
Figura 39 – CCAS independentes (n=3), para análise de glicerina e xarope, obtidas pelo MMQO, construídas pelas médias de leituras das triplicatas das respostas instrumentais para DEG (<i>m/z</i> 75), seguido do respectivo gráfico de resíduos.....	123
Figura 40 – CCAS independentes (n=3), para análise de glicerina e xarope, obtidas pelo MMQO, construídas pelas médias de leituras das triplicatas das respostas instrumentais para MeOH (<i>m/z</i> 15), seguido do respectivo gráfico de resíduos.....	123
Figura 41 – CCEMBF independentes (n=3), para análise de propilenoglicol, obtidas pelo MMQO, construídas pelas médias de leituras das triplicatas das respostas instrumentais para EG (<i>m/z</i> 61), seguido do respectivo gráfico de resíduos.....	124
Figura 42 – CCEMBF independentes (n=3), para análise de propilenoglicol, obtidas pelo MMQO, construídas pelas médias de leituras das triplicatas das respostas instrumentais para DEG (<i>m/z</i> 61), seguido do respectivo gráfico de resíduos.....	124
Figura 43 – CCEMBF independentes (n=3), para análise de propilenoglicol, obtidas pelo MMQO, construídas pelas médias de leituras das triplicatas das respostas instrumentais para MeOH (<i>m/z</i> 15), seguido do respectivo gráfico de resíduos.....	125
Figura 44 – Resultados analíticos em concentrações crescentes de somatório de EG e DEG em amostras de cervejas contaminadas.....	162
Figura 45 – Histograma das cervejas contaminadas com pelo menos um dos glicóis tóxicos – EG e/ou DEG.....	163
Figura 45 – Cromatograma (abundância de íons <i>versus</i> tempo) da amostra de xarope contaminado com EG (em cima) e DEG (embaixo), em concentrações superiores ao LD e inferiores ao LQ do método.....	164

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas dos glicóis mencionados nesse trabalho	29
Tabela 2 – Informações dos métodos analíticos descritos na literatura para EG e/ou DEG em diversas matrizes, apresentados em ordem cronológica..	37
Tabela 3 – Programa de temperatura do forno da coluna nos métodos por GC-MS.....	48
Tabela 4 – Descrição do preparo de CCAS de EG e DEG.....	51
Tabela 5 – Descrição do preparo de CCEMBF de EG e DEG em cervejas.	51
Tabela 6 – Descrição do preparo de CCAS de EG, DEG e MeOH.....	55
Tabela 7 – Descrição do preparo de amostras fortificadas de GLI ou PPG.	55
Tabela 8 – Descrição do preparo da CCEMBF de EG, DEG e MeOH em PPG.....	58
Tabela 9 – Protocolo de execução do estudo de exatidão e precisão de EG e DEG em cervejas.....	64
Tabela 10 – Descrição do preparo de amostras fortificadas de GLI e PPG..	65
Tabela 11 – Resumo dos resultados de validação dos métodos analíticos desenvolvidos.....	94
Tabela 12 – Critério de aceitabilidade para variação da razão de íons em GC, modo de ionização por impacto eletrônico	105
Tabela 13 – Resultados obtidos na comparação estatística dos interceptos e inclinações de CCAS e CCEMBF.....	112
Tabela 14 – Resultados da comparação estatística das concentrações, obtidas mediante emprego de CCAS, de amostras de analito em solvente puro e amostras de analito em matriz fortificadas em quatro níveis de concentração de EG, DEG e MeOH para glicerina.....	114
Tabela 15 – Resultados da comparação estatística das concentrações, obtidas mediante emprego de CCAS, de amostras de analito em solvente puro e amostras de analito em matriz fortificadas em quatro níveis de concentração de EG, DEG e MeOH para propilenoglicol.....	115
Tabela 16 – Resultados da comparação estatística das concentrações, obtidas mediante emprego de CCAS, de amostras de analito em solvente	

puro e amostras de analito em matriz fortificadas em três níveis de concentração de EG, DEG e MeOH para xaropes.....	116
Tabela 17 – Resultados do teste F para avaliação de homocedasticidade dos resíduos.....	118
Tabela 18 – Equações da curva obtidas no estudo de linearidade de CCAS e CCEMBF.....	119
Tabela 19 – Parâmetros obtidos para o estudo de linearidade de CCAS e CCEMBF – estatística t_w e coeficientes de correlação (r_w) e de determinação (r_w^2).....	120
Tabela 20 – Resultados do estudo de efeito residual para EG e DEG.....	127
Tabela 21 – Resultados do estudo de exatidão para EG (m/z 61) para análise de cerveja.....	129
Tabela 22 – Resultados do estudo de exatidão para DEG (m/z 75) para análise de cerveja.....	130
Tabela 23 – Resultados do estudo de exatidão para EG (m/z 31) para análise de glicerina.....	131
Tabela 24 – Resultados do estudo de exatidão para DEG (m/z 75) para análise de glicerina.....	132
Tabela 25 – Resultados do estudo de exatidão para MeOH (m/z 15) para análise de glicerina.....	133
Tabela 26 – Resultados do estudo de exatidão para EG (m/z 31) para análise de propilenoglicol.....	134
Tabela 27 – Resultados do estudo de exatidão para DEG (m/z 75) para análise de propilenoglicol.....	135
Tabela 28 – Resultados do estudo de exatidão para MeOH (m/z 15) para análise de propilenoglicol.....	136
Tabela 29 – Resultados do estudo de exatidão para EG (m/z 61) para análise de xarope.....	137
Tabela 30 – Resultados do estudo de exatidão para DEG (m/z 75) para análise de xarope.....	138
Tabela 31 – Resultados do estudo de exatidão para MeOH (m/z 15) para análise de xarope.....	139

Tabela 32 – Resultados do estudo de precisão para EG (<i>m/z</i> 61) para análises de cerveja.....	140
Tabela 33 – Resultados do estudo de precisão para DEG (<i>m/z</i> 75) para análises de cerveja.....	141
Tabela 34 – Resultados do estudo de precisão para EG (<i>m/z</i> 31) para análises de glicerina.....	142
Tabela 35 – Resultados do estudo de precisão para DEG (<i>m/z</i> 75) para análises de glicerina.....	143
Tabela 36 – Resultados do estudo de precisão para MeOH (<i>m/z</i> 15) para análises de glicerina.....	144
Tabela 37 – Resultados do estudo de precisão para EG (<i>m/z</i> 31) para análises de propilenoglicol.....	145
Tabela 38 – Resultados do estudo de precisão para DEG (<i>m/z</i> 75) para análises de propilenoglicol.....	146
Tabela 39 – Resultados do estudo de precisão para MeOH (<i>m/z</i> 15) para análises de propilenoglicol.....	147
Tabela 40 – Resultados do estudo de precisão para EG (<i>m/z</i> 61) para análises de xarope.....	148
Tabela 41 – Resultados do estudo de precisão para DEG (<i>m/z</i> 75) para análises de xarope.....	149
Tabela 42 – Resultados do estudo de precisão para MeOH (<i>m/z</i> 15) para análises de xarope.....	150
Tabela 43 – Limites de detecção e quantificação, instrumentais e nas matrizes, para EG, DEG e MeOH em cada método de análise desenvolvido.....	151
Tabela 44 – Informações e resultados do estudo de estabilidade de STmix 1 mg.L ⁻¹	153
Tabela 45 – Informações e resultados do estudo de estabilidade de SEmix 10.000 mg.L ⁻¹	154
Tabela 46 – Informações e resultados do estudo de estabilidade da ST do padrão interno.....	154

Tabela 47 – Concentração, incerteza expandida e recuperação das soluções das amostras fortificados no LQ, inicial, após 24 e 56 horas de preparo.....	155
Tabela 48 – Incerteza dos valores de concentração de EG e DEG em amostras de cerveja fortificadas no LQ do método.....	157
Tabela 49 – Incerteza dos valores de concentração de EG, DEG e MeOH em amostras de GLI fortificadas no LQ do método.....	158
Tabela 50 – Incerteza dos valores de concentração de EG, DEG e MeOH em amostras de PPG fortificadas no LQ do método.....	159
Tabela 51 – Incerteza dos valores de concentração de EG, DEG e MeOH em amostras de xaropes fortificadas no LQ do método.....	160

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anova	Análise de variância
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
1,4-BuOH	1,4-butanediol
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
CCAS	Curva de calibração do analito em solvente
CCEMBF	Curva de calibração de extrato de matriz branca fortificado
DART	<i>Direct Analysis in Real-Time</i> ; Análise Direta em Tempo Real
DEG	Dietilenoglicol
DGA	<i>Diglycolic acid</i> ; ácido diglicólico
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
EC	<i>European Commission</i>
EG	Etilenoglicol
EIC	<i>Extracted ion chromatogram</i> , cromatograma de íon extraído
EUA	Estados Unidos da América
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i> ; Organização para Alimentação e Agricultura das Nações Unidas
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> ; Organização dos Estados Unidos da América para regulação de alimentos e medicamentos.
FID	<i>Flame Ionization Detection</i> ; detecção por ionização em chama
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared</i> ; Infravermelho por Transformada de Fourier
g	giros
GA	<i>Glycolic acid</i> ; ácido glicólico
GC	<i>Gas Chromatography</i> ; cromatografia a gás
GLI	Glicerol
HEAA	<i>2-hydroxyethoxyacetic acid</i> ; ácido 2-hidroxiacético
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> ; Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
I	Número de níveis de concentração da curva de calibração
IN	Instrução Normativa
J	Número de prepare de soluções independentes da curva de calibração
k	Fator de abrangência
Jecfa	<i>Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives</i>
L	Número de injeções de uma solução da curva de calibração
LD	Limite de detecção
LIC	Limite inferior da curva de calibração
LMP	Limite máximo permitido
log P	Logaritmo do coeficiente de partição octanol – água

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS (CONTINUAÇÃO)

LQ	Limite de quantificação
LSC	Limite superior da curva de calibração
MAPA	Ministério da Agricultura e Pecuária
MeOH	Metanol
m/m	Relação massa por massa
MMQO	Método dos Mínimos Quadrados Ordinários
MMQP	Método dos Mínimos Quadrados Ponderados
MRS	Material de Referência Certificado
MS	<i>Mass Spectrometry</i> , espectrometria de massas
MS/MS	<i>Tandem Mass Spectrometry</i> ; espectrometria de massas sequencial
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
N.A.	Não se aplica
NIR	<i>Near Infrared</i> ; Espectrometria de Infravermelho Próximo
Nist	<i>National Institute of Standards and Technology</i> ; Instituto Nacional de Padronização e Tecnologia dos Estados Unidos da América
OMS	Organização Mundial de Saúde
PFTBA	Perfluorotributilamina
PI	Padrão interno
Ph. Eur.	European Pharmacopeia; Farmacopéia Européia
PPG	Propilenoglicol
QTOF	Quadrupole – Time of Flight; Analisador híbrido quadrupolo – tempo de voo
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
rpm	Rotações por minuto
SE	Solução estoque
SEmix	Solução estoque mix = solução estoque contendo uma mistura (pool) dos analitos
SIM	<i>Selected Ion Monitoring</i> ; Monitoramento de íons selecionados
SQR	Substância química de referência
S/R	Relação sinal/ruído
ST	Solução de trabalho
STmix	Solução de trabalho mix = solução de trabalho contendo uma mistura (pool) dos analitos
TIC	<i>Total ion chromatogram</i> ; cromatograma de íons totais
TR	Tempo de retenção
U	Incerteza expandida
UHPLC	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i> ; Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
USP	<i>United States Pharmacopeia</i> ; Farmacopeia dos Estados Unidos da América
v/v	Relação volume por volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 OBJETIVOS	24
2.1 Geral.....	24
2.2 Específicos.....	24
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
3.1 Álcoois tóxicos.	25
3.2 Glicóis.....	29
3.3 Histórico de eventos envolvendo álcoois tóxicos.....	31
3.4 Regulamentação de glicóis em medicamentos, cosméticos e alimentos.....	34
3.5 Métodos analíticos para determinação de etileno glicóis.....	36
4. MATERIAIS	43
4.1 Reagentes, solventes e padrões de referência.....	43
4.2 Amostras.....	43
4.2.1 Amostras de cervejas.....	43
4.2.2 Amostras de xaropes.....	44
4.3 Materiais e vidrarias.....	44
4.4 Equipamentos.....	44
4.4.1 Equipamentos de bancada.....	44
4.4.2 Equipamentos de análise instrumental.....	45
4.4.2.1 Sistema de GC-MS empregado nos testes iniciais e para verificar pureza de EG, DEG, PPG, 1,4-BuOH e etanol.....	45
4.4.2.2 Sistema de GC-MS empregado na otimização das condições instrumentais, validação e análises do método de EG e DEG em cervejas; e otimização das condições instrumentais do método de EG, DEG e MeOH em GLI, PPG e xaropes.....	46
4.4.2.3 Sistema de GC-MS empregado na validação e análises do método de EG, DEG e MeOH em GLI, PPG e xaropes.....	46
5. MÉTODOS	47
5.1 Otimização das condições experimentais.....	47
5.2 Preparo de amostra.....	48

5.2.1 Análise das cervejas.....	48
5.2.2 Análise de propilenoglicol e glicerina.....	49
5.2.3 Análise dos xaropes.....	49
5.3 Validação.....	49
5.3.1 Seletividade.....	49
5.3.1.1 Efeito matriz.....	50
5.3.1.1.1 Estudo de efeito matriz em cerveja.....	50
5.3.1.1.2 Estudo de efeito matriz em glicerina, propilenoglicol e xaropes.....	54
5.3.2 Linearidade.....	57
5.3.2.1 Linearidade na análise de cerveja.....	58
5.3.2.2 Linearidade na análise de glicerina e xaropes.....	58
5.3.2.3 Linearidade na análise de propilenoglicol.....	58
5.3.2.4 Tratamento estatístico da linearidade.....	58
5.3.3 Efeito residual.....	62
5.3.4 Exatidão e Precisão.....	63
5.3.4.1 Execução do estudo de exatidão e precisão em cerveja.....	63
5.3.4.2 Execução do estudo de exatidão e precisão em glicerina e propilenoglicol.....	64
5.3.4.3 Execução do estudo de exatidão e precisão em xaropes.....	65
5.3.4.4 Tratamento dos dados de exatidão e precisão.....	65
5.3.5 Limite de detecção e limite de quantificação.....	66
5.3.6 Estudo de estabilidade.....	66
5.3.6.1 Estabilidade das soluções dos analitos em solvente.....	67
5.3.6.2 Estabilidade do padrão interno.....	68
5.3.6.3 Estabilidade das soluções diluídas de cerveja.....	68
5.4 Estimativa da incerteza de medição.....	68
5.5 Análises de amostras de cerveja.....	75
5.6 Análises de amostras de xarope.....	75
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	76
6.1 Otimização das condições experimentais.....	76
6.2 Otimização do preparo de amostra.....	91
6.2.1 Preparo de amostras de cerveja.....	91

6.2.2 Preparo de amostras de glicerina e propilenoglicol.....	92
6.2.3 Preparo de amostras de xarope.....	93
6.3 Validação.....	93
6.3.1 Seletividade.....	97
6.3.1.1 Seletividade para o método de determinação de EG e DEG em cerveja.....	97
6.3.1.2 Seletividade para o método de determinação de EG, DEG e MeOH em glicerina, propilenoglicol e xaropes.....	105
6.3.1.3 Efeito matriz.....	112
6.3.1.3.1 Efeito matriz nas análises de cerveja.....	112
6.3.1.3.2 Efeito matriz nas análises de glicerina, propilenoglicol e xaropes.....	113
6.3.2 Linearidade.....	117
6.3.3 Efeito residual.....	126
6.3.4 Exatidão e Precisão.....	128
6.3.5 Limite de detecção e limite de quantificação.....	151
6.3.6 Estudo de estabilidade.....	153
6.3.6.1 Estudo de estabilidade dos analitos em solvente.....	153
6.3.6.2 Estabilidade do padrão interno.....	154
6.3.6.3 Estabilidade das soluções diluídas de cerveja.....	155
6.4 Estimativa da incerteza de medição.....	156
6.5 Análises de amostras de cerveja.....	161
6.6 Análises de amostras de xaropes, soluções, suspensões e emulsões orais.....	164
7. CONCLUSÕES.....	166
REFERÊNCIAS.....	169
APÊNDICE.....	175

1. INTRODUÇÃO

Os medicamentos e os alimentos, termo que inclui bebidas, são bens de consumo que devem ser submetidos a efetivo controle de forma a garantir sua qualidade, identidade e segurança. Tal controle é essencial para a proteção tanto dos consumidores, quanto das indústrias de medicamentos e de alimentos que são comprometidas com a qualidade de seus produtos

No Brasil, entre os produtos com interesse para a saúde regulados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), podem-se citar os excipientes farmacêuticos, os ingredientes alimentares e os medicamentos. Já o controle e fiscalização de alimentos no Brasil é uma responsabilidade compartilhada entre órgãos e entidades da Administração Pública. No âmbito das análises de bebidas, o Ministério da Agricultura e Pecuária (Mapa) fiscaliza e regulamenta a produção de bebidas e os padrões relacionados aos produtos. Por sua vez, a Anvisa regulamenta o uso de aditivos alimentares, coadjuvantes de tecnologia, materiais para contato com alimentos, substâncias saneantes, entre outros, na produção de bebidas. Não obstante as competências dos órgãos fiscalizadores, a obrigatoriedade do controle e garantia de qualidade, identidade e segurança de ingredientes farmacêuticos, medicamentos e bebidas recaem sobre o responsável pelo produto.

Em decorrência de diversos episódios de contaminação de medicamentos e de alimentos ocorridos nas últimas décadas, aspectos relacionados à sua qualidade, identidade e segurança ganharam maior importância e atraíram a atenção da sociedade. Isso gera a demanda para o desenvolvimento e aplicação de técnicas analíticas avançadas que permitam identificar e monitorar contaminantes em insumos farmacêuticos, ingredientes alimentares, medicamentos e alimentos, com alto grau de confiança. Entre estas, a cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (GC-MS; do inglês *Gas Chromatography - Mass Spectrometry*) possui grande aplicação, por apresentar alta detectabilidade aliada à alta seletividade. Os resultados obtidos em análises empregando essa técnica produzem informações valiosas para

verificação da segurança, qualidade e autenticidade dos produtos, sendo muito úteis para as ações de regulação exercidas pelas autoridades competentes.

Entre os episódios de contaminação humana relacionados ao consumo de alimentos e medicamentos relatados na literatura, identifica-se a substituição de insumos alimentares e farmacêuticos, tais como a glicerina e propilenoglicol, por compostos tóxicos da classe dos etileno glicóis ou a utilização de glicerina e propilenoglicol com a presença de contaminantes como o etilenoglicol, dietilenoglicol e metanol. Assim, é essencial que sejam desenvolvidos métodos analíticos capazes de identificar e quantificar contaminantes nas próprias matérias-primas que entrarão na composição do alimento ou medicamento, utilizando métodos de alta detectabilidade e seletividade. Desta forma, a identificação da contaminação dessas matérias-primas por compostos tóxicos já é feita no início do processo, atuando de forma preventiva. Além disso, o desenvolvimento de métodos analíticos para identificação e quantificação de contaminantes em alimentos e medicamentos é crucial para evitar eventos de contaminação em massa.

A tese que se quer defender, no presente trabalho, é que é possível, por meio da aplicação de GC-MS, desenvolver métodos analíticos para determinação simultânea de etilenoglicol e dietilenoglicol em cerveja e para determinação simultânea de etilenoglicol, dietilenoglicol e metanol em glicerina, propilenoglicol e xaropes farmacêuticos, que sejam seletivos, precisos, exatos e apresentem detectabilidade adequada ao fim a que se destinam. O desenvolvimento de métodos multianalitos e com procedimentos de preparo de amostra simplificados são cruciais para possibilitar o emprego em rotina de monitoramento pelos órgãos oficiais de controle.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Desenvolver e validar métodos multianalitos, empregando GC-MS, visando a determinação simultânea de etilenoglicol e dietilenoglicol em cerveja e a determinação simultânea de etilenoglicol, dietilenoglicol e metanol em glicerina, propilenoglicol e xaropes farmacêuticos.

2.2 Específicos

- Desenvolver e validar método analítico, com preparo de amostra simples e empregando GC-MS com ionização por impacto eletrônico, para a determinação simultânea dos contaminantes etilenoglicol e dietilenoglicol em cerveja.
- Desenvolver e validar método analítico, com preparo de amostra simples e empregando GC-MS com ionização por impacto eletrônico, para a determinação simultânea dos contaminantes etilenoglicol, dietilenoglicol e metanol em glicerina, propilenoglicol e xaropes.
- Desenvolver um modelo de estimativa de incerteza dos resultados para todas as aplicações.
- Aplicar o método analítico validado para a determinação de etilenoglicol e dietilenoglicol em amostras de cerveja em operação de fiscalização do Ministério da Agricultura e Pecuária.
- Aplicar o método analítico validado para a determinação de etilenoglicol, dietilenoglicol e metanol em amostras de xaropes farmacêuticos comercializados no mercado nacional.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

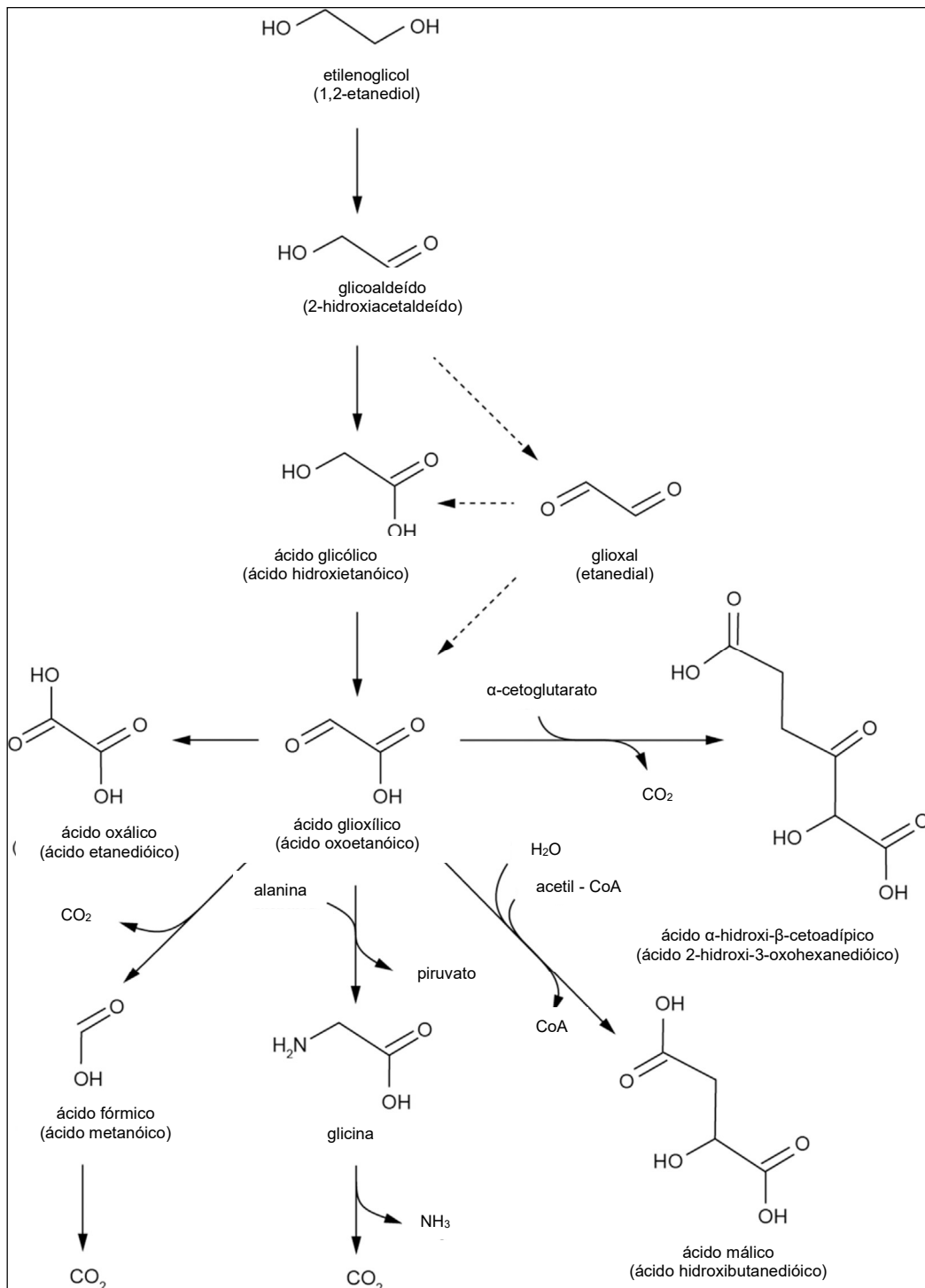
3.1 Álcoois tóxicos

O termo álcoois tóxicos pode referir-se a vários compostos, tais como etilenoglicol (EG), dietilenoglicol (DEG), isopropanol, metanol (MeOH) e propilenoglicol (PPG) que, a depender da dose de exposição, podem causar disfunções celulares e morte. Quando ingeridos, são rapidamente absorvidos pelo trato gastrointestinal e apresentam alta distribuição por todo o organismo devido a sua miscibilidade em água. Os sintomas de intoxicação são geralmente inespecíficos, o que pode levar ao diagnóstico tardio e aumentar o risco de danos irreversíveis aos órgãos, podendo evoluir a óbito (KRAUT & MULLINS, 2018). O PPG é consideravelmente menos tóxico do que os etileno glicóis, sendo inclusive empregado em vários produtos alimentares e farmacêuticos, e sua toxicidade é descrita em casos de superdosagem pela ingestão de líquidos anticongelantes (EHLERS *et al.*, 2013).

À exceção do isopropanol, os álcoois tóxicos não exercem os principais efeitos deletérios diretamente, mas estes resultam de seus metabólitos. A enzima álcool desidrogenase catalisa a primeira oxidação dos álcoois tóxicos. Os aldeídos resultantes (exceto acetona proveniente do isopropanol) sofrem oxidações posteriores pela enzima aldeído desidrogenase, formando ácidos carboxílicos: MeOH é metabolizado a ácido fórmico, EG a ácido oxálico e ácido glicólico (GA), DEG a ácido 2-hidroxiacético (HEAA) e o ácido diglicólico (DGA); e PPG a ácido D-lático e ácido-L-lático (FOWLES *et al.*, 2017; KRAUT & MULLINS, 2018). É possível, ainda, que seja formado EG a partir da hidrólise da ligação éter no monoaldeído formado a partir de DEG ou do HEAA; entretanto, essa via de metabolismo é minoritária (FOWLES *et al.*, 2017). A enzima álcool desidrogenase é uma enzima crítica que modula a formação dos metabólitos tóxicos, sendo que esta é retardada pela coingestão de etanol, um substrato competitivo da referida enzima (FOWLES *et al.*, 2017; KRAUT & MULLINS, 2018).

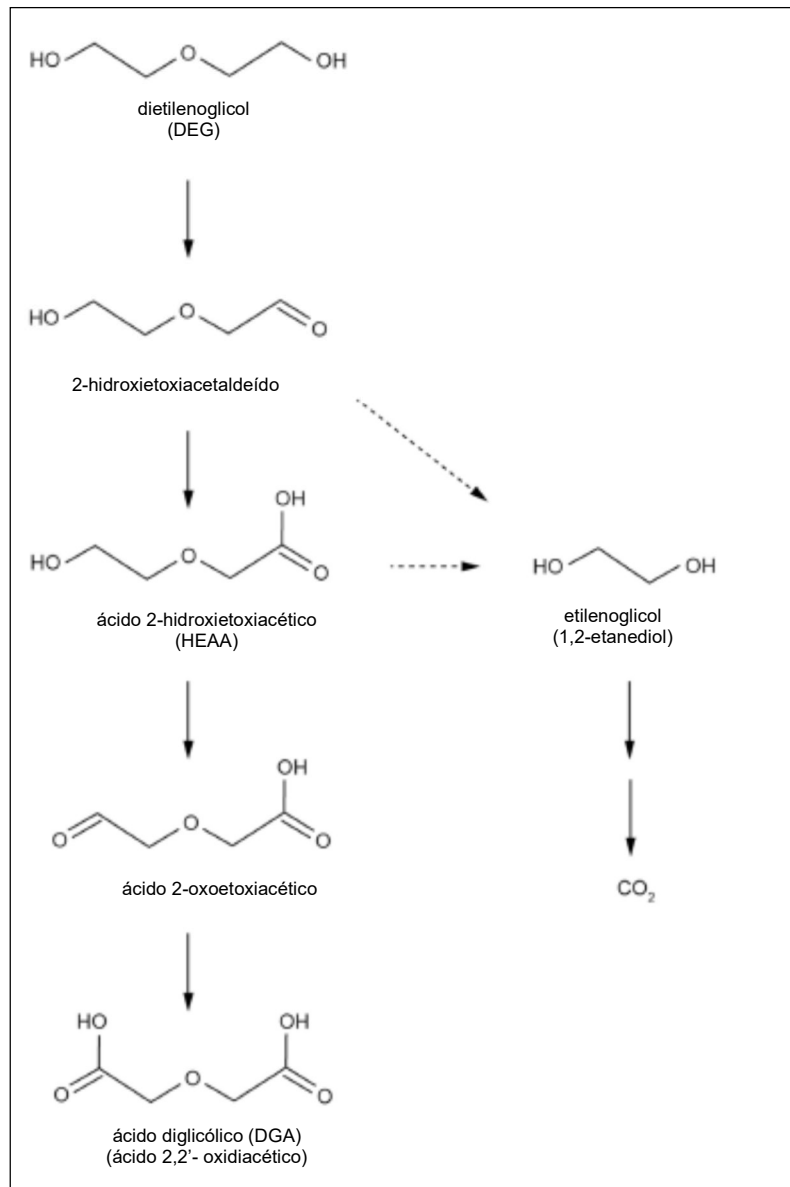
EG e DEG são compostos de elevada toxicidade. Quando em baixas doses, podem ser removidos rapidamente do organismo humano. Porém, se ingeridos em altos níveis, diversos efeitos tóxicos são reportados (XING *et al.*, 2009). As Figuras 1 e 2 apresentam, respectivamente, o metabolismo de EG e DEG.

Figura 1 - Via metabólica do EG.



Fonte: adaptado de FOWLES *et al.*, 2017

Figura 2 - Via metabólica do DEG.



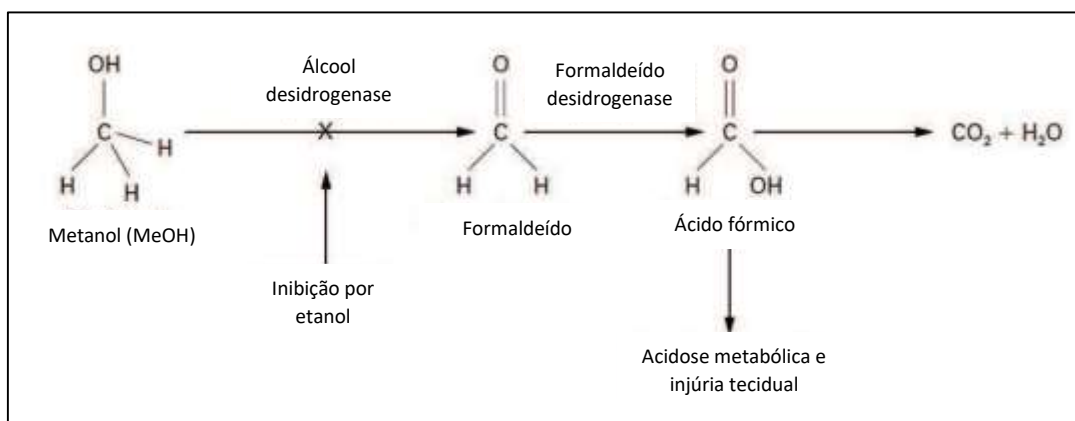
Fonte: adaptado de FOWLES *et al.*, 2017

A toxicidade desses compostos em humanos resulta da ingestão e progride por três estágios. O primeiro estágio, nas primeiras 12 horas da ingestão, é causado pelo glicol não metabolizado e caracteriza-se por distúrbios gastrintestinais e depressão do sistema nervoso central que são típicas de intoxicações por solvente, incluindo náuseas e vômitos, convulsões, depressão dos reflexos e coma. O segundo estágio é o cardiopulmonar que resulta da acidose metabólica causada pelo acúmulo de ácidos carboxílicos no sangue. Em casos extremos, a acidose pode resultar em morte por depressão respiratória. O terceiro estágio,

que só ocorre nas intoxicações por EG e DEG, é a falência renal proveniente do acúmulo de diácidos ou oxalatos nos rins (FOWLES *et al.*, 2017). Também é comum o desenvolvimento de disfunções neurológicas, podendo levar a danos nos nervos cranianos, estado mental alterado, neuropatia central e periférica (algumas vezes levando à quadriplegia), perda visual e auditiva (XING *et al.*, 2009; KRAUT & MULLINS, 2018).

Conforme mencionado, o MeOH também sofre a ação da enzima álcool desidrogenase, formando formaldeído. Este posteriormente gera ácido fórmico pela ação da enzima formaldeído desidrogenase. O ácido fórmico dissocia-se no meio, gerando prótons e íons formato (Figura 3). Dependendo da quantidade presente, o ácido fórmico pode induzir acidose metabólica severa, que pode levar à morte, e é também o principal agente responsável pela toxicidade ocular (TÜRKMEN *et al.*, 2008; CLARY, 2013).

Figura 3 - Via metabólica do MeOH.



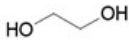
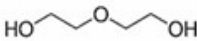
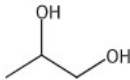
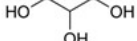
Fonte: adaptado de GOSH & ROY, 2018

A intoxicação por metanol é associada a perda visual em 29 a 72% dos casos. Ocasionalmente, ocorre cegueira, disfunção pulmonar, dor abdominal e coma; raramente são observados sintomas parkinsonianos. Achados clínicos geralmente surgem de seis a 24 horas da exposição, porém podem ser retardados para 72 a 96 horas caso ocorra coingestão de etanol. Sequelas neurológicas podem ocorrer dias ou semanas após exposição (KRAUT & MULLINS, 2018).

3.2 Glicóis

Etileno glicóis representam uma série de oligômeros orgânicos lineares e sintéticos com aumento de unidades oxietileno por molécula com fórmula molecular genérica $H(OCH_2CH_2)_nOH$, na qual n é um número inteiro que varia de 1 a 5 (FOWLES *et al.*, 2017). Dentre estes, pode-se citar o EG cujo n é igual a 1, e o DEG, com n igual a 2 (Tabela 1).

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas dos glicóis mencionados nesse trabalho.

Substância	etilenoglicol	dietilenoglicol	propilenoglicol	glicerol
Abreviação	EG	DEG	PPG	GLI
Principais sinônimos	etano-1,2-diol; monoetilenoglicol	2,2'-oxidietano; 2-(2-hidroxi)etanol	propano-1,2-diol; 1,2-propanediol	glicerina; propano-1,2,3-diol
Número CAS	107-21-1	111-46-6	57-55-6	56-81-5
Fórmula molecular	$C_2H_6O_2$	$C_4H_{10}O_3$	$C_3H_8O_2$	$C_3H_8O_3$
Fórmula estrutural				
Massa molar (g.mol ⁻¹)	62,07	106,12	76,09	92,09
Temperatura de ebulição (°C)	197,3	244-245	188,2	290,0
Pressão de vapor (hPa) a 25 °C	0,067	0,013	0,0106	0,00001
Densidade (g cm ⁻³) a 20 °C	1,1135	1,18	1,036	1,2613
Viscosidade (mPa S) a 25 °C	16,1	35,7	42	1412
Solubilidade em água (g L ⁻¹)	>1000	>1000	380	5296
log P a 25 °C	-1,36	-1,98	-1,008 ± 0,215	-1,76

Fonte: FOWLES *et al.*, 2017; SciFinder; PubChem

Os etileno glicóis apresentam aplicação como líquidos refrigerantes, materiais anti-gelo em aeronaves, fluidos para transferência de calor, resinas de poliéster, solventes, intermediários químicos e no tratamento de gases (FOWLES *et al.*, 2017).

Apesar de não serem da série de etileno glicóis, os glicóis PPG e o glicerol (GLI) (Tabela 1) são compostos que se assemelham a eles em termos de aparência,

odor e sabor. O termo glicerina é amplamente empregado na literatura como referência ao glicerol. Todos estes compostos constantes na Tabela 1 são incolores e possuem sabor adocicado. Eles apresentam alta viscosidade, alta solubilidade em água e e em diversos solventes orgânicos e baixa pressão de vapor. Entretanto, apenas o PPG e a GLI são considerados seguros, nas doses usualmente empregadas, em alimentos, cosméticos e medicamentos. Essas substâncias possuem custo mais elevado que EG e DEG (HOLLOWAY *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2011).

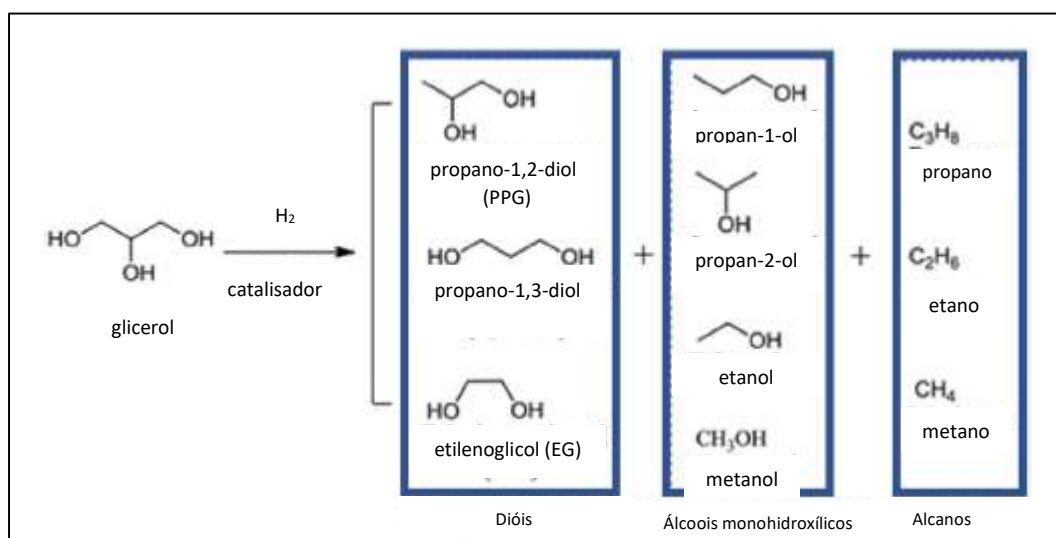
O GLI e o PPG possuem várias aplicações, incluindo uso em alimentos para humanos, alimentos para animais, preparações farmacêuticas, produtos de higiene pessoal e cosméticos, nos quais agem como umectante, solvente e lubrificante, em ampla gama de produtos. Podem ainda ser usados como agentes anticongelantes (OKOLIE, 2022; PAGLIARO, 2017).

Atualmente, a principal forma de produção da glicerina é por meio da purificação do glicerol bruto, sendo este um dos principais subprodutos formado no processo de produção do biodiesel. Sua formação ocorre por meio de uma reação de transesterificação que converte gordura animal ou óleos vegetais e álcoois em biodiesel, na presença de catalisadores. Entretanto, a reação de transesterificação produz quantidades significativas de glicerol bruto, o que a torna não atrativa do ponto de vista ambiental e econômico. O glicerol bruto, que compreende cerca de 10% em peso dos produtos finais obtidos da reação de transesterificação, tem baixo valor comercial devido a sua composição heterogênea. Ele contém cerca de 80% de glicerol e 20% de impurezas incluindo água, sabão, MeOH, ésteres metílicos de ácidos graxos e elementos inorgânicos (OKOLIE, 2022).

O PPG pode ser comercialmente produzido pela hidrólise do óxido de propileno. Entretanto, o óxido de propileno é obtido a partir de matérias-primas petroquímicas. Fatores tais como poluição, mudança climática e declínio das reservas petrolíferas são preocupantes, o que promove o interesse em rotas de produção alternativas (OKOLIE, 2022).

Neste contexto, é interessante a conversão das expressivas quantidades de glicerol produzidas no processamento do biodiesel em outros produtos, com destaque para acroleína, carbonato de glicerol, etanol, PPG e ácido láctico. A produção de PPG a partir do glicerol ocorre por meio de uma reação conhecida como hidrogenólise seletiva. O processo envolve a quebra de ligações C-O, remoção de grupos hidroxilas, seguida de adição simultânea de hidrogênio na presença de um catalisador. Além disso, a dissociação de grupos hidroxila presentes no meio geram propano-1,3-diol. Muitos subprodutos tais como EG, MeOH, propanol e metano podem ser produzidos a partir da reação (Figura 4) (OKOLIE, 2022).

Figura 4 – Produtos obtidos da hidrogenólise catalítica do glicerol.



Fonte: adaptado de OKOLIE, 2022

3.3 Histórico de eventos envolvendo álcoois tóxicos

As principais informações de toxicidade humana do MeOH referem-se à sua ingestão deliberada ou acidental como um substituto do etanol. Os primeiros dados relatados em humanos também contêm informações de superexposição ocupacional, tanto por inalação quanto por via dérmica. A maioria dos dados é resultado de uma única superexposição. São raros os relatos de toxicidade do MeOH devido à exposição subletal repetida (CLARY, 2013). A intoxicação por MeOH é mais comum após ingestão de fluidos automotivos de limpadores de

parabrisa, produtos industriais, ou líquidos adulterados (KRAUT & MULLINS, 2018).

A maior parte dos relatos na literatura a respeito de envenenamento de humanos por EG se refere a casos isolados de ingestão intencional (LETH & GREGERSEN, 2005), sendo a maioria por tentativa de suicídio, além de casos isolados de ingestão acidental por crianças e animais domésticos, devido ao seu sabor adocicado (GOLDFRANK *et al.*, 2002). Tais ocorrências são relativamente comuns em locais em que o acesso a essa substância é favorecido devido ao seu uso como anticongelante automotivo e fluido de arrefecimento, entre outros usos considerados domésticos (MAPA, 2020).

Contaminações por DEG, por outro lado, tendem a ocorrer de forma mais abrangente, devido ao seu uso na falsificação, adulteração ou contaminação acidental, por exemplo, de GLI ou PPG de grau farmacêutico ou alimentício. Apesar das dificuldades de se estabelecer a relação de causalidade em investigações epidemiológicas dessa natureza, o que gera considerável subnotificação, vários surtos em diversos países relacionam envenenamentos em massa por DEG a sintomas característicos de falência renal, que são os primeiros indicativos de contaminação por essa substância (MAPA, 2020).

O primeiro e um dos casos mais emblemáticos de envenenamento em massa por ingestão de DEG, ocorreu nos EUA em 1937, quando mais de cem pessoas morreram após ingerirem xarope de sulfanilamida cuja formulação utilizava DEG como diluente para o princípio ativo (HERNÁNDEZ *et al.*, 2008; SELF, 2013; SCHEP *et al.*, 2009). Até aquele momento, as indústrias farmacêuticas não tinham obrigação legal de realizarem estudos toxicológicos antes da comercialização de novos medicamentos. Após esse episódio, a legislação dos EUA passou a exigir mais testes de controle de qualidade dos medicamentos e das matérias primas, regulados pela agência norte-americana *Food and Drug Administration* (FDA) (AHMED *et al.*, 2010; SELF, 2013). A legislação de diversos outros países foram também se ajustando a novos padrões de exigência de qualidade analítica.

Posteriormente, diversos outros episódios de envenenamento por DEG ocorreram em vários países ao longo dos anos, nos quais este glicol foi veiculado, em substituição ao PPG ou GLI, em diversas formas farmacêuticas e cosméticas, de maneira acidental ou não. Estimam-se que milhares de pessoas foram a óbito pelo consumo de xaropes contaminados por DEG (HERNÁNDEZ *et al.*, 2008; SELF, 2013). Recentemente, em 2022, a Organização Mundial de Saúde (OMS) informou ter encontrado uma "quantidade inaceitável" de DEG e EG em quatro xaropes para tosse produzidos na Índia e disponíveis no Gâmbia, fato este que ocasionou a morte de pelo menos 70 crianças no país africano (BBC, 2022; WHO, 2022).

Também são relatados dois casos envolvendo contaminação de vinhos. O mais importante deles ocorreu na Áustria em 1985, quando produtores fraudaram vinhos de baixa qualidade adicionando DEG com a intenção de aumentar a sensação de corpo e dulçor, simulando as características sensoriais de vinhos de colheita tardia e afetados por *Botrytis cinerea* (podridão nobre), mais valorizados (STOECKL, 2006). No ano seguinte, vinhos italianos também apresentaram contaminações, com concentrações de EG e DEG de 2,0 a 6,7 mg.L⁻¹, porém a investigação indicou que essa contaminação teria sido acidental, proveniente possivelmente de um solvente contaminado com DEG que teria sido usado na limpeza dos fermentadores e tubulações da vinícola (GAETANO & MATTA, 1987 apud MAPA, 2020).

Possíveis formas de contaminação de EG e DEG em alimentos incluem o emprego de matérias primas contaminadas com etileno glicóis ou uma possível transferência de líquidos refrigerantes ao alimento por falha em seu processo produtivo. É importante mencionar que DEG pode ser usado como preservativo para adesivos de polietileno que são empregados em embalagens de alimentos, podendo ocorrer sua migração a partir do filme plástico para o alimento, fato este que já levou à intoxicação humana, conforme já reportado na literatura (RAHIM *et al.*, 2011).

Durante o processo de produção cervejeiro, líquidos anticongelantes podem ser empregados nas etapas que requerem arrefecimento, que ocorrem após

brasagem para atingir a temperatura de fermentação, após conclusão da fermentação para início da maturação e, algumas vezes, no armazenamento após envase. Dentre os líquidos refrigerantes empregados, podem-se citar compostos não tóxicos como o etanol ou PPG e, em alguns casos, compostos tóxicos da família dos etileno glicóis. *A priori*, o líquido refrigerante não deve entrar em contato com a cerveja produzida. A legislação em vigor não prevê as substâncias que são permitidas nas instalações e equipamentos no processo produtivo de cerveja. Em geral, a legislação de Boas Práticas de Fabricação prevêem a utilização somente de produtos e processos que não comprometam a inocuidade da bebida (MAPA, 2020).

Recentemente, foram relatados casos de intoxicação característicos de ingestão de EG e DEG no Brasil, cuja causalidade foi atribuída ao consumo de cerveja contaminada por estes compostos tóxicos (MAPA, 2020).

3.4 Regulamentação de glicóis em medicamentos, cosméticos e alimentos

Não existe uso aprovado para EG e DEG em medicamentos, cosméticos e alimentos. Por outro lado, conforme mencionado anteriormente, GLI e PPG podem ser empregados.

Atualmente, não há legislação que estabeleça valor de limite máximo permitido (LMP) dos etileno glicóis em alimentos, sendo proibido seu uso para este fim (RAHIM *et al.*, 2011). Não são encontrados relatos ou registros envolvendo a ocorrência natural de EG ou DEG em alimentos e bebidas, de tal forma que todas as referências encontradas citam essas substâncias como contaminantes que não possuem nenhuma razão para estarem presentes em alimentos (MAPA, 2020).

Devido à sua elevada toxicidade aguda, os limites permitidos de EG e DEG como contaminantes residuais em outros produtos – tais como aditivos ou materiais de embalagens, estes sim permitidos em alimentos – costumam ser bastante baixos. O *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (Jecfa) elenca EG e DEG como impurezas em aditivos alimentares, sendo que a especificação

do aditivo, bem como a avaliação da quantidade do próprio aditivo que será permitida, é feita levando-se em conta a exposição do consumidor a essas impurezas. O Comitê Científico para Alimentos da Comissão Europeia admite uma ingestão tolerável diária de 0,5 miligramas por quilograma de peso corpóreo para o somatório de EG e DEG. Com base nesse parâmetro e considerando-se as possíveis fontes de exposição do consumidor a esses contaminantes, a Autoridade Europeia para Segurança de Alimentos, estabelece limites para a presença de EG e DEG em polisorbatos e polietilenoglicol na faixa de 0,25%, individualmente ou combinados. Analogamente, o FDA admite até 0,2% de EG e DEG em polietilenoglicol, autorizado como aditivo em alguns tipos de alimentos. A Anvisa prevê que embalagens ou equipamentos que contenham derivados do etilenoglicol em sua composição devem ser fabricadas de modo tal que a quantidade máxima de EG e DEG transferida ao alimento, a partir da embalagem, seja de 30 mg Kg^{-1} , expresso em EG (MAPA, 2020).

A legislação europeia apresenta o limite de 0,1% m/m de DEG em produtos cosméticos acabados, já que este pode estar presente como contaminante de matérias-primas empregadas na produção desses artigos (EC, 2009).

Na farmacopeia dos EUA - *United States Pharmacopeia* (USP) - está prevista a análise de EG e DEG nas matérias-primas GLI e PPG (The UNITED, 2020a; 2020b). Na farmacopeia europeia - *European Pharmacopeia* (Ph. Eur.) - consta o método para determinação apenas de DEG em GLI. A Ph. Eur. prevê, ainda, um método por GC-FID (do inglês, *Gas Chromatography- Flame Ionization Detection*) para quantificação de EG e DEG em substâncias surfactantes etoxiladas, que são passíveis de apresentarem resíduos destes em decorrência de seu processo de produção (The EUROPEAN, 2019a; 2019b).

Em contraste, na Farmacopeia Brasileira não há previsão para determinação dos compostos tóxicos EG e DEG em GLI ou PPG (FARMACOPEIA, 2019), o que é um fator de preocupação, uma vez que esses contaminantes podem estar presentes nos insumos empregados na fabricação de medicamentos e cosméticos. A presença dos compostos tóxicos pode ser devido a impurezas do processo produtivo de PPG, quando proveniente do glicerol bruto que, conforme

explanado, pode levar a formação de subprodutos como etileno glicóis e MeOH, ou, mais frequentemente, pode ocorrer de forma intencional, pela adulteração e/ou troca dos excipientes farmacêuticos por EG ou DEG, que são compostos mais baratos e com propriedades físico-químicas semelhantes (AHMED *et al.*, 2010; HOLLOWAY *et al.*, 2010; MAPA, 2020).

3.5 Métodos analíticos para determinação de etileno glicóis

Diversas técnicas analíticas são descritas na literatura para análise de etileno glicóis em diferentes matrizes, sendo que, pelas características físico-químicas desse grupo de compostos, a cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas é a técnica mais indicada para sua análise. A Tabela 2 traz informações sobre as características de métodos encontrados na literatura, englobando os analitos, a técnica, o procedimento de preparo de amostra e suas principais limitações.

O levantamento descrito na Tabela 2 demonstra que a técnica mais utilizada para análise de EG e/ou DEG em GLI e PPG é GC-FID. A concentração da amostra de GLI e PPG injetada no sistema é relativamente alta, 50.000 mg L⁻¹, em decorrência da limitação da técnica em termos de detectabilidade. Isso pode acarretar menor tempo de vida útil da coluna cromatográfica e do *liner*, bem como maior necessidade de intervenção no equipamento. O emprego de GC-MS para esta análise é vantajoso no sentido de ser possível injetar menor quantidade de amostra no sistema, por ser uma técnica de maior detectabilidade, além de ser também mais seletiva. Não foram encontrados estudos para análise conjunta de EG e DEG em GLI e PPG por GC-MS.

Já em relação a produtos acabados, existem métodos analíticos publicados para análise de EG e/ou DEG em creme dental por GC-MS e por GC-FID (Tabela 2).

Apesar dos inúmeros casos de intoxicação humana por etileno glicóis a partir do consumo de xaropes contaminados, descritos na literatura, apenas dois estudos para análise de DEG nessa matriz foram localizados, um empregando a técnica de GC-FID (BAFFI *et al.*, 2000) e o outro a de DART-MS (SELF, 2013).

Tabela 2 – Informações dos métodos analíticos descritos na literatura para EG e/ou DEG em diversas matrizes, apresentados em ordem cronológica.

Referência	Analitos	Matriz	Preparo de amostra	Técnica	Limitações
KAISER & RIEDER, 1985	DEG	Vinho	Sem tratamento da amostra.	GC-FID	Método com apenas um analito. Método mais sujeito a interferências do que GC-MS. Não foi estudado o efeito matriz.
CACCAMO <i>et al.</i> , 1986	DEG	Vinho	SPE empregando cartucho Carbopack BIp-4.	GC-FID	Necessidade da etapa de purificação da amostra em cartucho e método com apenas um analito.
LAWRENCE <i>et al.</i> , 1986	DEG	Vinho	O mesmo descrito em LAU & WEBER, 1987.	GC-FID	Método com apenas um analito e preparo de amostra com mais etapas. Método mais sujeito a interferências do que GC-MS. Não foi estudado o efeito matriz.
LAU & WEBER, 1987	DEG	Vinho	1 mL de vinho é transferido para um tubo de centrifuga de 5 mL, seguido da adição de 30 mg de um agente descolorante (carvão). Faz-se homogeneização em vortex e, a seguir, aguarda-se o carvão sedimentar. Uma alíquota de 200 µL do vinho é transferida para um vial e diluída com 800 µL de acetonitrila. A solução é misturada, resfriada em banho de gelo por 15 minutos e, então, filtrada a 0,45 µm.	GC-MS/MS	Método com apenas um analito e preparo de amostra com mais etapas. Não foi estudado o efeito matriz.
BAFFI <i>et al.</i> , 2000	DEG	Xaropes de três formulações – antipirético, multivitamínico e antianêmico	As amostras de xaropes são diluídas em água destilada, empregando fator de diluição apropriado para cada caso.	GC-FID	O limite de detecção foi de 150 mg L ⁻¹ limite de quantificação foi de 1.000 mg L ⁻¹ . Apenas um analito.

Tabela 2 – Informações dos métodos analíticos descritos na literatura para EG e/ou DEG em diversas matrizes, apresentados em ordem cronológica (continuação).

Referência	Analitos	Matriz	Preparo de amostra	Técnica	Limitações
FDA, 2007	DEG e EG	Creme dental	Adiciona-se 5 ml de água a 1 g de creme dental e a mistura é submetida a vórtex. A seguir, adiciona-se 5 mL de acetonitrila em duas porções. Centrifuga-se a 5000 g por 10 minutos. Transfere-se 0,5 mL do sobrenadante ao vial contendo padrão interno.	GC-MS	A faixa de concentração dos analitos injetada no equipamento está entre 100 a 500 mg L ⁻¹ , de tal forma que menores limites de detecção e quantificação não foram relatados.
HERNÁNDEZ <i>et al.</i> , 2008	DEG	Creme dental	Aproximadamente 1,0 g de creme dental é transferido para um tubo de centrifuga de 50 mL e extraído com 10 mL de água em agitador mecânico por 30 min. Após centrifugação a 3500 rpm por 15 min, o sobrenadante é diluído 10 vezes com água ultrapura.	UHPLC-MS (QTOF)	Método com apenas um analito. Apenas relatados os limites de detecção e quantificação instrumentais e relativamente elevados – 8 mg Kg ⁻¹ e 50 mg Kg ⁻¹ , respectivamente.
LÓPEZ-SÁNCHEZ <i>et al.</i> , 2008	DEG	Creme dental	Sem tratamento da amostra.	FTIR com reflexão total atenuada e quimiometria	A faixa de concentração testada é alta. Método com apenas um analito.
AHMED <i>et al.</i> , 2010	DEG	Glicerina (veículo de xarope)	Sem tratamento da amostra.	FTIR e NIR	Apenas detecção de um analito.
HOLLOWAY <i>et al.</i> , 2010	EG e DEG	Glicerina e creme dental	Glicerina: Diluída em metanol. Creme dental: Aproximadamente 1,0 g de creme dental é misturado com 5,0 mL de água e 5,0 mL de acetonitrila. A mistura é centrifugada a 2000 rpm por 30 min. 5,0 mL do sobrenadante é misturado com padrão interno e a solução resultante é filtrada.	GC-FID	Necessidade de injeção de glicerina em alta concentração no sistema pelo emprego de técnica menos sensível (GC-FID).

Tabela 2 – Informações dos métodos analíticos descritos na literatura para EG e/ou DEG em diversas matrizes, apresentados em ordem cronológica (continuação).

Referência	Analitos	Matriz	Preparo de amostra	Técnica	Limitações
FU <i>et al.</i> , 2011	DEG	Creme dental	Adiciona-se 0,2 ml de água a 1 g de creme e a mistura é homogeneizada. Então, 9,8 mL de etanol e 2 g de sulfato de sódio anidro são adicionados, agita-se a mistura em vórtex, e centrifuga-se a 5000 g por 10 minutos. O sobrenadante é filtrado em membrana de 0,45 µm.	GC-MS	Apenas relatados os limites de detecção e quantificação instrumentais e relativamente elevados – 25 mg Kg ⁻¹ e 50 mg Kg ⁻¹ , respectivamente. Método com apenas um analito.
RAHIM <i>et al.</i> , 2011	DEG, dietilenoglicol monoetil éter, cafeína e cumarina	Refrigerantes, sucos, fórmulas infantis, papinhas, cereais, farinhas e snacks	Refrigerantes: Injeção direta após filtração em membrana. Produtos com alto conteúdo aquoso: Diluição em MeOH para obter uma mistura MeOH:água 10:1. Em todos os casos as amostras foram submetidas a ultrassom por 10 min à temperatura ambiente.	GC-FID	O método não tem EG no escopo. Os valores de limite de quantificação reportados no artigo referem-se aos limites de quantificação instrumentais, e não nas amostras. Método mais sujeito a interferências do que GC-MS. Não foi estudado o efeito matriz.
TOKUNAGA <i>et al.</i> , 2012	EG e DEG	Glicerina e propilenoglicol	Diluição dos excipientes em metanol.	GC-FID	Necessidade de injeção de glicerina em alta concentração para atingir um LQ de 500 mg L ⁻¹ . Concentração dos analitos testada foi alta.
SELF, 2013	EG e DEG	Preparações farmacêuticas e cosméticas que empregam glicerina como diluente	Sem tratamento da amostra.	DART-MS	Apenas monitoramento de um íon por analito, o que pode limitar a seletividade. Fortificação das amostras feita em apenas um nível, igual a 1.000 mg L ⁻¹ . Limites de detecção e quantificação calculados, não comprovados experimentalmente.

Tabela 2 – Informações dos métodos analíticos descritos na literatura para EG e/ou DEG em diversas matrizes, apresentados em ordem cronológica (continuação).

Referência	Analitos	Matriz	Preparo de amostra	Técnica	Limitações
The EUROPEAN, 2019a	DEG	Glicerina	Diluição em água.	GC-FID	A concentração de trabalho é relativamente alta. Necessidade de injeção de glicerina em alta concentração no sistema pelo emprego de técnica menos sensível. Apenas um analito.
The UNITED, 2020a	EG e DEG	Glicerol	Diluição em metanol.	GC-FID	A concentração de trabalho é relativamente alta. Necessidade de injeção de glicerina em alta concentração no sistema pelo emprego de técnica menos sensível.
The UNITED, 2020a	EG e DEG	Glicerol	Diluição em metanol.	GC-FID	A concentração de trabalho é relativamente alta. Necessidade de injeção de glicerina em alta concentração no sistema pelo emprego de técnica menos sensível.
The UNITED, 2020b	EG e DEG	Propilenoglicol	Diluição em metanol.	GC-FID	A concentração de trabalho é relativamente alta. Necessidade de injeção de glicerina em alta concentração no sistema pelo emprego de técnica menos sensível.
OIV, 2022	DEG	Vinhos	Extração líquido-líquido	GC-FID	Método com apenas um analito. Preparo de amostra trabalhoso e com emprego de éter dietílico como solvente orgânico.

Legenda: DART – Análise Direta em Tempo Real (do inglês *Direct Analysis in Real-Time*); FTIR - Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (do inglês *Fourier Transform Infrared*); NIR - Espectroscopia de Infravermelho Próximo (do inglês: *Near Infrared*), QTOF – Analisador híbrido quadrupolo – tempo de voo (do inglês *Quadrupole- Time of Flight*); UHPLC - Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (do inglês: *Ultra-High Performance Liquid Chromatography*).

Analisando a Tabela 2, também é possível perceber a escassez de estudos na área de alimentos. Foram localizados apenas cinco estudos, sendo quatro deles mais antigos para determinação de DEG em vinho (KAISER & RIEDER, 1985; CACCAMO *et al.*, 1986; LAWRENCE *et al.*, 1986; LAU & WEBER, 1987) e um outro, mais recente, englobou a determinação de DEG e outras substâncias em refrigerantes, sucos, fórmulas infantis, papinhas, cereais, farinhas e *snacks* por GC-FID (RAHIM *et al.*, 2011). Apenas um desses estudos empregou a técnica de GC-MS (LAU & WEBER, 1987). Devido à escassez de publicações nesta área e à real possibilidade de contaminação de alimentos por etileno glicóis, compostos de notável toxicidade, mais estudos de desenvolvimento de métodos analíticos para determinação desses compostos em alimentos são necessários.

Os recentes relatos de intoxicação de pessoas por EG e DEG, devido ao consumo de cerveja contaminada no Brasil, demandou o desenvolvimento e validação de novo método analítico que superasse as limitações dos métodos atualmente existentes, já que inexistiam métodos de análise publicados na literatura que preconizassem a determinação simultânea de EG e DEG em alimentos. Em outras matrizes existem métodos publicados para determinação concomitante de EG e DEG, mas a faixa de concentração de trabalho é maior e as matrizes são menos complexas. Assim, faz-se necessário desenvolvimento de método analítico para quantificação simultânea de EG e DEG em cerveja, com baixo limite de detecção e quantificação. Ainda, não há informações sobre efeito matriz nos estudos atualmente publicados, de tal forma que é necessário realizar esta avaliação para verificar a melhor curva de calibração a ser empregada para estimativa dos resultados analíticos.

Esta revisão da literatura evidenciou que, independentemente da intenção culposa ou dolosa, existe a real possibilidade de troca na utilização dos insumos alimentares e farmacêuticos (GLI e PPG) por EG e/ou DEG no processo de produção de alimentos ou medicamentos, ou, ainda, existe a possibilidade de utilização dos insumos previstos (GLI e PPG), porém contaminados com os compostos tóxicos da classe dos etileno glicóis. Desta forma, é essencial que sejam desenvolvidos métodos analíticos capazes de identificar e quantificar EG e DEG nas próprias matérias-primas que entrarão na composição do alimento

ou medicamento, utilizando métodos de alta detectabilidade e seletividade. É também de interesse a possibilidade de acoplar-se a estes métodos outros contaminantes do processo de produção de GLI e PPG, como o MeOH. Desta forma, a identificação da contaminação dessas matérias-primas por compostos tóxicos já é feita no início do processo, atuando de forma preventiva. É importante ressaltar que não foram encontrados na literatura métodos analíticos que preconizam a determinação simultânea de EG, DEG e MeOH.

Além disso, o desenvolvimento de métodos analíticos para identificação e quantificação de EG, DEG e MeOH em medicamentos que levem GLI e PPG na composição, como os xaropes, é crucial para evitar eventos de contaminação em massa. Isso é ainda mais crítico pelo fato da forma farmacêutica xarope ser amplamente empregada na farmacoterapia do público infantil.

4. MATERIAIS

4.1 Reagentes, solventes e padrões de referência

- Água ultrapura.
- Solventes de grau HPLC e/ou GC-MS: acetonitrila, Merck (Darmstadt, Alemanha); etanol, Merck (Darmstadt, Alemanha); etanol, Scharlau (Espanha); metanol, J T Baker (México); metanol, Scharlau (Espanha).
- Reagentes de grau analítico: etanol absoluto, Ciavikko (Sabará, Brasil); 1,2-propanodiol, Sigma Aldrich (Alemanha).; 1,4-butanediol, Sigma Aldrich (Saint Louis, EUA); glicerina, Neon (São Paulo, Brasil).
- Substâncias químicas de referência (SQR): etilenoglicol e dietilenoglicol, Sigma Aldrich (Overijse, Bélgica), Supelco (EUA) e Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemanha); 1,2-propanodiol Sigma Aldrich (Lt Louis, MO, EUA) e metanol, Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemanha).

4.2 Amostras

4.2.1 Amostras de cervejas

As amostras de cervejas foram coletadas pelo Serviço de Inspeção de Produtos de Origem Vegetal de Minas Gerais (Sipov-MG), do Mapa, em operação de fiscalização. Ao todo foram coletadas 701 amostras de cerveja, compreendendo 125 diferentes marcas e 49 fabricantes. Destas, 612 amostras eram provenientes de um mesmo fabricante, alvo de investigação, que foram coletadas de dentro do estabelecimento produtor e do comércio. As outras 89 amostras, de diferentes marcas e fabricantes, nacionais e importadas, foram obtidas apenas do comércio. As amostras coletadas foram enviadas ao Laboratório de Defesa Agropecuária de Minas Gerais (LFDA-MG), do Mapa, onde as análises foram realizadas. Observa-se que a coleta de amostra e a execução das análises foi feita de forma independente no âmbito da fiscalização do Mapa. As informações das amostras coletadas, incluindo suas composições, encontram-se descritas no Apêndice A.

4.2.2 Amostras de xaropes e de soluções, suspensões ou emulsões orais

As amostras de xaropes farmacêuticos, soluções, suspensões e emulsões orais, que continham GLI e/ou PPG na composição da formulação, foram obtidas por aquisição direta em drogarias ou por doação, totalizando 36 amostras, sendo 33 amostras comerciais, 1 lote piloto industrial e 2 lotes placebo industriais. As amostras possuíam diferentes marcas e/ou diferentes lotes, englobando, também, diferentes fármacos e composições. As informações dessas amostras constam no Apêndice B.

4.3 Materiais e Vidrarias

- Balões volumétricos de vidro borossilicato, classe A, calibrados, capacidade de 5, 10 e 25 mL.
- Coluna capilar para cromatografia a gás. Fase: polietilenoglicol Rtx-Wax; 30 m comprimento x 0,25 mm diâmetro interno; 0,25 µm espessura.
- Consumíveis empregados compatíveis com os sistemas de GC-MS descritos em 4.3.2: *liner*, anel tipo O (*o-ring*), septo, seringa do injetor, anilha, ponteira para conexão de coluna cromatográfica (*ferrule*).
- Frascos de vidro para estocar soluções padrão.
- Frasco tipo vial, com capacidade de 1,5 mL.
- Pipeta de Pasteur em vidro.
- Ponteiras compatíveis com as micropipetas descritas no item 4.3.1.
- Tubo de centrifuga de fundo cônico (Falcon), em polipropileno, de 50 mL.
- Tubo de centrifuga de fundo cônico (Falcon), em polipropileno, de 15 mL.

4.4 Equipamentos

4.4.1 Equipamentos de bancada

- Agitador vórtex IKA, modelo MS2 MiniShaker (Waltham, EUA).
- Balança analítica Kern, modelo ALI 2204 (Balinge, Alemanha).
- Balança analítica Sartorius, modelo BP 211D (Alemanha).
- Centrifuga Thermo Scientific Heraeus Multifuge X3R (EUA).

- Micropipeta calibrada com capacidade de medição entre 50 e 100 μL , Gilson (Middleton, EUA).
- Micropipeta calibrada com capacidade de medição entre 200 e 1000 μL , Gilson (Middleton, EUA).
- Micropipeta calibrada com capacidade de medição entre 1000 e 5000 μL , Axypet AP 5000 (EUA).
- Purificador de água MILLIPORE MILLI-Q Integral 5.

4.4.2 Equipamentos de análise instrumental

Neste trabalho foram utilizados três sistemas de GC-MS, em decorrência da disponibilidade de equipamento em determinados momentos do estudo. O sistema de GC-MG da Agilent, descrito no item 4.4.2.1 a seguir, foi empregado apenas nos testes iniciais e na verificação de pureza de alguns padrões. Para o desenvolvimento e validação de todos os métodos analíticos desenvolvidos neste trabalho, bem como para a análise das amostras, foram empregados os sistemas de GC-MS da Shimadzu, descritos nos itens 4.4.2.2 e 4.4.2.3 a seguir. Importante mencionar que estes dois sistemas da Shimadzu são compostos de módulos de diferentes modelos, porém apresentam desempenhos semelhantes e compatíveis, de forma que foi possível o uso de um ou outro sistema de forma intercambiável.

4.4.2.1 Sistema de GC-MS empregado nos testes iniciais e para verificar pureza de EG, DEG, PPG, 1-4-BuOH e etanol

Inicialmente, foi empregado sistema de cromatografia a gás e espectrometria de massas sequencial Agilent (EUA), composto pelos módulos: cromatógrafo gasoso modelo GC System 7890A, espectrômetro de massas triplo quadrupolo modelo GC/MS Triple Quad 7000 e amostrador automático modelo 7693. O equipamento utilizava o software Mass Hunter GC/MS Acquisition versão B.07.01.1805, para aquisição de dados, e os softwares MassHunter Workstation Software Qualitative Analysis versão B.06.00 e MassHunter Workstation Software

Quantitative Analysis versão B.07.00, para as determinações qualitativa e quantitativa, respectivamente.

4.4.2.2 Sistema de GC-MS empregado na otimização das condições instrumentais, validação e análises do método de EG e DEG em cervejas; otimização das condições instrumentais do método de EG, DEG e MeOH em GLI, PPG e xaropes; e análises de amostras de xaropes.

Nesta etapa do estudo, foi utilizado sistema de cromatografia a gás multidimensional Shimadzu (Japão), composto pelos módulos: cromatógrafo a gás modelo GC 2010 Plus e amostrador automático modelo AOC-5000 Plus, acoplado ao espectrômetro de massas modelo GCMS-QP2010 Ultra com fonte de ionização por impacto eletrônico e analisador de íons do tipo quadrupolo. O sistema era equipado com o software GCMS solution, versão 4.41, para aquisição e tratamento dos dados.

4.4.2.3 Sistema de GC-MS empregado na validação do método de EG, DEG e MeOH em GLI, PPG e xaropes

Sistema de cromatografia a gás Shimadzu (Japão) foi utilizado nesta etapa do projeto. Este equipamento era composto pelos módulos: cromatógrafo a gás modelo GC-2010 contendo injetor automático modelo AOAC-20i e amostrador automático modelo AOC-20S, acoplado ao espectrômetro de massas modelo GCMS-QP2010 Plus com fonte de ionização por impacto eletrônico e analisador de íons do tipo quadrupolo. O sistema era equipado com *software* GCMS solution para aquisição e tratamento de dados.

5. MÉTODOS

Os métodos analíticos desenvolvidos e validados empregaram a técnica de GC-MS para quantificação de EG e DEG e/ou MeOH em GLI, PPG, cervejas e xaropes farmacêuticos, empregando padronização interna. O 1,4-butanediol (1,4-BuOH) foi empregado como o padrão interno (PI) do método.

5.1 Otimização das condições instrumentais

Inicialmente, as soluções dos padrões de referência dos analitos EG e DEG, do PI e o branco (etanol:água 8:2 ou etanol) foram injetadas no sistema GC-MS Agilent (4.3.2.1), e a solução do padrão de MeOH foi injetada no sistema GC-MS Shimadzu (4.3.2.3), no modo de varredura total ou *full scan*, para verificação da pureza dos padrões de referência.

A seguir, as soluções padrão de EG, DEG e MeOH foram injetadas no GC-MS Shimadzu, equipamento empregado nas análises de validação e nas análises de amostras reais, no modo *full scan*, para seleção dos íons com relação massa-carga (m/z) de maior intensidade a serem monitorados no modo de Monitoramento de Íons Seleccionados (SIM, do inglês *Selected Ion Monitoring*). O modo de aquisição foi otimizado com o *software* sob condição de autotune, calibrado com perfluorotributilamina (PFTBA). As condições instrumentais definidas para o método foram as seguintes:

- Fase estacionária: coluna capilar de sílica com revestimento de polietilenoglicol Rtx-Wax; 30 m x 0,25 mm; 0,25 μ m.
- Fase móvel (gás carreador): hélio.
- Vazão da coluna: 1,0 mL min⁻¹.
- Vazão da purga: 3,0 mL min⁻¹.
- Vazão total: 29,0 mL min⁻¹.
- Temperatura do injetor: 250 °C.
- Modo de injeção: *split* (taxa de 1:25 para cervejas; e 1:6 para GLI, PPG e xarope).

- Volume de injeção: 0,50 μL (no caso das cervejas) e 1,00 μL (no caso de GLI, PPG e xarope).
- Temperatura da fonte de íons: 230 $^{\circ}\text{C}$.
- Temperatura da interface entre os módulos de GC e MS: 250 $^{\circ}\text{C}$.
- Programa de temperatura do forno da coluna: descrito na Tabela 3.

Tabela 3 – Programa de temperatura do forno da coluna nos métodos por GC-MS.

Método de análise de EG e DEG em cervejas			Método de análise de EG, DEG e MeOH em GLI, PPG e xaropes		
Taxa de aquecimento ($^{\circ}\text{C min}^{-1}$)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo mantido (min)	Taxa de aquecimento ($^{\circ}\text{C min}^{-1}$)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo mantido (min)
---	100	1	---	40	1
10	250	4	5	50	0
			50	100	1
			10	250	4

- Íons monitorados no método analítico para cerveja: m/z 45, 43, 61 e 31 (entre 4,0 e 7,0 minutos de corrida); m/z 44,0, 75, 57, 45 e 71 (entre 7,0 e 17,5 minutos de corrida).
- Íons monitorados no método analítico para GLI, PPG e xarope: m/z 15, 29, 31 e 32 (entre 0,5 e 2,9 minutos de corrida); m/z 31, 61 e 43 (entre 6,0 e 11,0 minutos de corrida); m/z 44, 45, 57, 71 e 75 (entre 12,0 e 14,0 min de corrida); m/z 31, 43, 44, 57, 61 e 71 (entre 15,0 e 19,0 min de corrida).

5.2 Preparo de amostra

5.2.1 Análise das cervejas

Para a realização das análises, as amostras de cerveja foram diluídas em solvente apropriado, empregando fator de diluição de cinco vezes visando introdução de menor conteúdo de componentes da matriz no equipamento GC-MS. Para a diluição das amostras, testou-se água, etanol, acetonitrila e MeOH.

5.2.2 Análise de propilenoglicol e glicerina

Para a realização das análises as amostras de PPG ou GLI foram diluídas a 5.000 mg.L⁻¹ empregando etanol como diluente.

5.2.3 Análise dos xaropes

Para a realização das análises, as amostras de xarope foram diluídas dez vezes em água e etanol (3:7 v/v) e, em seguida, diluída mais dez vezes em etanol.

5.3 Validação

5.3.1 Seletividade

Para estudo da seletividade do método analítico, os cromatogramas de íon totais (TIC, do inglês *total ion chromatogram*) e os cromatogramas de íon extraído (EIC, do inglês, *extracted ion chromatogram*) dos padrões dos analitos (EG, DEG e MeOH) e do PI diluídos em solvente (etanol) foram obtidos para verificação da presença de possíveis íons interferentes e também foram comparados ao do solvente puro.

O estudo de seletividade na cerveja foi feito por comparação do perfil dos cromatogramas de amostras brancas e amostras brancas fortificadas com os analitos (EG e DEG), com o PI e com PPG, de modo a verificar se a cerveja branca possuía os mesmos íons *m/z* nos mesmos TR dos analitos. Já a avaliação de PPG, molécula estruturalmente relacionada aos analitos de interesse, teve por objetivo verificar se sua presença poderia afetar a seletividade do método.

O estudo de seletividade nas matérias-primas de PPG e GLI foi feito por comparação do perfil dos cromatogramas de amostras brancas e amostras brancas fortificadas com os analitos (EG, DEG e MeOH) e com o PI, de modo a verificar se as matérias-primas brancas possuíam os mesmos íons *m/z* nos mesmos TR dos analitos.

O estudo de seletividade no xarope foi feito por comparação do perfil dos cromatogramas de amostras brancas e amostras brancas fortificadas com os analitos (EG, DEG e MeOH) e com o PI, de modo a verificar se o fármaco ou os excipientes da formulação possuíam os mesmos íons m/z nos mesmos TR dos analitos.

5.3.1.1 Efeito matriz

5.3.1.1.1 Estudo de efeito matriz em cerveja

Existem dois procedimentos descritos em MAPA (2011) para verificar a existência do efeito matriz. Para verificar a existência do efeito matriz na análise das cervejas empregou-se o método de comparação dos interceptos e das inclinações de três curvas de calibração do analito em solvente (CCAS) independentes e de três curvas de calibração em extrato de matriz branca fortificado (CCEMB) independentes.

Para construção das CCAS, massas conhecidas de cada analito – EG e DEG - foram mensuradas em balança analítica, diretamente em balões volumétricos calibrados, cujo volume foi completado com etanol, gerando soluções estoque (SE) individuais, de concentração aproximada 10.000 mg L^{-1} . A partir da diluição destas em etanol, preparou-se uma solução estoque contendo EG e DEG (SEmix), de concentração 1.000 mg L^{-1} . Partindo-se da SEMix, foram preparadas soluções padrões dos analitos nas concentrações dos níveis de calibração 20, 30 e 50 mg L^{-1} , empregando diluições em etanol. Já os níveis 3, 5 e 10 mg L^{-1} foram preparados a partir de uma segunda diluição, ou seja, a partir da diluição, em etanol, de soluções de trabalho contendo EG e DEG, denominadas soluções de trabalho mix (STmix), originárias de uma SEMix (Tabela 4).

A construção das CCEMBF consta na Tabela 5 e encontra-se descrita a seguir.

Tabela 4 – Descrição do preparo de CCAS de EG e DEG.

Nível da curva (mg L ⁻¹)	Concentração das SE individuais (mg L ⁻¹)	Concentração da SEMix (mg L ⁻¹)	Volume pipetado da SEMix (mL)	Volume final da STmix (mL)	Concentração da STmix (mg L ⁻¹)	Volume pipetado da STmix (mL)	Volume final da STmix diluída (mL)	Concentração da STmix diluída (mg L ⁻¹) = soluções que compõem CCAS
3	~10000	1000	0,3	10	30	0,1	1,0	3
5			0,5	10	50	0,1	1,0	5
10			0,5	10	50	0,2	1,0	10
20			0,2	10	20	-	-	20
30			0,3	10	30	-	-	30
50			0,5	10	50	-	-	50

Tabela 5 – Descrição do preparo de CCEMBF de EG e DEG em cervejas.

Nível da curva (mg L ⁻¹)	Concentração das SE individuais (mg L ⁻¹)	Concentração da SEMix (mg L ⁻¹)	Volume pipetado da SEMix (mL)	Volume final da STmix (mL)	Concentração da STmix (mg L ⁻¹)	Volume pipetado da STmix (mL)	Volume final das soluções que compõem CCEMBF (mL)	Concentração das soluções que compõem CCEMBF (mg L ⁻¹)
3	~50000	10000	0,3	10	300	0,1	10	3
5			0,5	10	500			5
10			1,0	10	1000			10
20			1,0	5	2000			20
30			1,5	5	3000			30
50			2,5	5	5000			50

Foram preparadas SE individuais de EG e DEG, de concentração aproximada 50.000 mg L⁻¹. A partir destas, preparou-se a SEMix de concentração aproximada 10.000 mg L⁻¹. A partir de diluições específicas desta SEMix em etanol, foram preparadas STmix de diferentes concentrações, as quais foram empregadas para fortificação das soluções de matriz branca, obtidas empregando o procedimento padronizado de preparo de amostra de uma cerveja branca (item 6.2.1). Foram, então, preparadas as soluções que compõem a curva de calibração. Para isso, 100 µL das STmix de diferentes concentrações foram diluídas para um volume final de 10 mL com a solução de matriz branca.

Após o preparo das soluções referentes aos níveis de calibração (CCAS ou CCEMBF), pipetou-se 1,0 mL dessas soluções (nas concentrações de cada nível) para vials contendo a quantidade fixa de 100 µL de uma solução de 1,4-BuOH 100 mg L⁻¹.

A avaliação estatística foi realizada conforme preconizado em MAPA (2011). Inicialmente, as variâncias dos interceptos e das inclinações das três CCAS e das três CCEMBF, por analito, foram comparadas por meio de um teste F. As equações 1 e 2 trazem as fórmulas para o cálculo da estatística F.

$$F = \frac{s_{a1}^2}{s_{a2}^2} \quad (1); \quad F = \frac{s_{b1}^2}{s_{b2}^2} \quad (2)$$

onde s_{a1}^2 e s_{a2}^2 são as variâncias dos interceptos, s_{b1}^2 e s_{b2}^2 são as variâncias das inclinações, sendo a maior variância no numerador.

O valor de F calculado foi comparado ao valor de F crítico obtido pela distribuição F para nível de significância α de 5%, sendo os graus de liberdade o número de níveis de concentração independentes das curvas de calibração de maior variância (N_{x1}) menos 1, no numerador, e o número de níveis de concentração independentes das curvas de calibração de menor variância (N_{x2}) menos um, no denominador.

Nos casos em que as variâncias de CCAS e CCEMBF foram equivalentes, fez-se o cálculo da variância agrupada conforme equações 3 e 4.

$$s_{a_1,a_2}^2 = \frac{(N_{x1}-1)s_{a_1}^2 + (N_{x2}-1)s_{a_2}^2}{(N_{x1}+N_{x2}-2)} \quad (3); \quad s_{b_1,b_2}^2 = \frac{(N_{x1}-1)s_{b_1}^2 + (N_{x2}-1)s_{b_2}^2}{(N_{x1}+N_{x2}-2)} \quad (4) ;$$

em que s_{a_1,a_2}^2 é a variância agrupada dos interceptos, s_{b_1,b_2}^2 é a variância agrupada das inclinações, N_{x1} e N_{x2} são os números de níveis de concentração independentes das curvas comparadas.

A seguir aplicou-se um teste t não pareado, bicaudal, para avaliar se as inclinações e os interceptos das curvas são estatisticamente iguais ou se são diferentes. Empregou-se nível de significância α de 5%. A hipótese nula (H_0) é que as médias dos resultados de inclinação ou intercepto não diferem entre CCAS e CCEMBF; e a hipótese alternativa (H_1) é que essas médias são diferentes.

Nos casos em que as variâncias de CCAS e CCEMBF foram equivalentes, o cálculo da estatística t foi feito conforme equações 5 e 6. O valor tabelado de t é obtido a partir da tabela de distribuição de t de Student, tendo $N_{x1} + N_{x2} - 2$ graus de liberdade e nível de significância $\alpha = 0,05$ (5%).

$$t_{a,calc} = \frac{|a_1 - a_2|}{\sqrt{s_{a_1,a_2}^2 \left(\frac{1}{N_{x1}} + \frac{1}{N_{x2}} \right)}} \quad (5); \quad t_{b,calc} = \frac{|b_1 - b_2|}{\sqrt{s_{b_1,b_2}^2 \left(\frac{1}{N_{x1}} + \frac{1}{N_{x2}} \right)}} \quad (6)$$

em que a_1 e a_2 são os valores dos interceptos de CCAS e CCEMBF; já b_1 e b_2 são os valores das inclinações de CCAS e CCEMBF.

Já no caso em que as variâncias foram diferentes, seguiu-se a equação 7. Neste caso, o valor tabelado de t foi obtido a partir da tabela de distribuição de t de Student, tendo como graus de liberdade (v), o resultado da equação 8, e nível de significância α de 5%.

$$t_{b,calc} = \frac{|b_1 - b_2|}{\sqrt{\frac{s_{b_1}^2}{N_{x1}} + \frac{s_{b_2}^2}{N_{x2}}}} \quad (7)$$

$$v = \frac{\left(\frac{s_{b_1}^2}{N_{x1}} + \frac{s_{b_2}^2}{N_{x2}} \right)^2}{\frac{\left(\frac{s_{b_1}^2}{N_{x1}} \right)}{N_{x1}+1} + \frac{\left(\frac{s_{b_2}^2}{N_{x2}} \right)}{N_{x2}+1}} - 2 \quad (8)$$

Caso o valor de t calculado fosse menor que o t crítico, para o grau de liberdade definido e probabilidade de significância de 5%, tanto para a inclinação, quanto para os interceptos, se poderia concluir que a matriz não afeta o ensaio. Do contrário, se poderia concluir que a matriz tem um efeito estatisticamente significativo sobre o resultado.

5.3.1.1.2 Estudo de efeito matriz em glicerina, propilenoglicol e xaropes

Para o método analítico de determinação de EG, DEG e MeOH em GLI, PPG e xaropes, empregou-se outro método descrito em MAPA (2011) para avaliação de efeito matriz. Para isso, preparou-se uma CCAS, com seis níveis de concentração (8). Frente a esta curva, foram quantificados os analitos EG, DEG e MeOH, em quatro níveis de concentração em amostras de GLI e PPG, e em três níveis de concentração em amostras de xarope, com seis réplicas cada de: 1) analitos em solvente puro (amostra não matrizada) e 2) analitos em matriz branca.

Para construção da CCAS (Tabela 6), massas conhecidas do padrão analítico de EG, DEG e MeOH foram mensuradas em balança analítica, diretamente em balões volumétricos calibrados, cujo volume foi completado com etanol, gerando SE individuais de cada padrão, de concentração aproximada 10.000 mg L^{-1} . A partir da diluição destas em etanol, foram preparadas duas soluções estoque em etanol contendo os três analitos, denominadas SEMix, de concentrações 1.000 mg L^{-1} e 100 mg L^{-1} . Partindo-se da SEMix 1.000 mg L^{-1} , foram preparadas as STmix nas concentrações determinadas para os níveis de calibração 20, 15, 10 e 5 mg L^{-1} , empregando diluições apropriadas em etanol. Já as STmix de concentrações 3 e 1 mg L^{-1} foram preparados a partir da SEMix 1.000 mg L^{-1} , empregando diluições apropriadas em etanol.

O preparo das amostras fortificadas de GLI e PPG consta na Tabela 7 e está descrito a seguir. Massas conhecidas de material de referência certificado (MRC) de EG, DEG e MeOH foram mensuradas em balança analítica, diretamente em balões volumétricos calibrados, cujo volume foi completado com etanol, gerando SE de concentração aproximada 10.000 mg L^{-1} . A partir da diluição destas em

etanol, foram preparadas duas SEMix, de concentrações 1.000 mg L⁻¹ e 100 mg L⁻¹. A balões volumétricos de 10 mL, adicionaram-se volumes conhecidos de SE de GLI ou PPG de concentração aproximada de 50.000 mg L⁻¹, para obter uma concentração final de GLI ou PPG de 5.000 mg L⁻¹. Estes insumos foram então fortificados com EG, DEG e MeOH pela adição de volumes apropriados de SEMix 1.000 mg L⁻¹ ou 100 mg L⁻¹, e o volume do balão volumétrico foi então completado a 10 mL com etanol.

Tabela 6 – Descrição do preparo de CCAS de EG, DEG e MeOH.

Nível da curva (mg L ⁻¹)	Concentração das SE individuais de EG, DEG e MeOH (mg L ⁻¹)	Concentração da SEMix (mg L ⁻¹)	Volume pipetado da SEMix (mL)	Volume final da STmix (mL)	Concentração da STmix (mg L ⁻¹)
1	10000	100	0,10	10	1
3			0,30	10	3
5			0,05	10	5
10		1000	0,10	10	10
15			0,15	10	15
20			0,20	10	20

Tabela 7 – Descrição do preparo das amostras fortificadas de GLI ou PPG.

Nível de fortificação (mg L ⁻¹)	Concentração das SE individuais de EG, DEG e MeOH (mg L ⁻¹)	Concentração da SEMix (mg L ⁻¹)	Volume pipetado de SE PPG ou GLI 50000 mg L ⁻¹ (mL)	Volume pipetado da SEMix (mL)	Volume final da STmix (mL)
1	10.000	100	1,0	0,10	10
3			1,0	0,30	10
10			1,0	0,10	10
20		1.000	1,0	0,20	10

Após o preparo das soluções referentes aos níveis de calibração (CCAS), bem como das amostras de GLI ou PPG fortificadas, pipetou-se 1,0 mL de cada uma dessas soluções para vials contendo a quantidade fixa de 100 µL de uma solução de 1,4-BuOH 100 mg L⁻¹.

O preparo das amostras de xaropes fortificados foi feito conforme descrito a seguir. A balões volumétricos de 10 mL, adicionou-se 1,0 mL de xarope (amostra branca), 2,0 mL de água ultrapura, volume apropriado de SEMix (a depender da concentração das SEMix preparadas) e etanol em quantidade suficiente para

completar o volume do balão, de forma a obter soluções dos analitos (EG, DEG e MeOH) nas concentrações 10, 100 ou 200 mg L⁻¹. Fez-se uma segunda diluição, transferindo-se 100 µL de cada balão para *vials* aos quais foram adicionados 900 µL de etanol e 100 µL de ST de 1,4-BuOH 100 mg L⁻¹, gerando soluções de xarope diluídas cem vezes e fortificadas com os analitos nas concentrações 1, 10 e 20 mg L⁻¹.

A avaliação estatística foi realizada conforme preconizado em MAPA (2011). Inicialmente, as variâncias das concentrações determinadas de EG, DEG e MeOH, em cada nível de concentração das amostras de analito em solvente puro e das amostras de analito em matriz, foram comparadas por meio de um teste F. A equação 9 traz a fórmula para o cálculo da estatística F.

$$F = \frac{s_{i1}^2}{s_{i2}^2} \quad (9)$$

onde s_{i1}^2 e s_{i2}^2 são as variâncias das amostras de analito em solvente e das amostras de analito em matriz ou vice-versa, sendo a maior variância no numerador.

Se em um dado nível de concentração i , o valor de F calculado fosse menor que o valor de F crítico, obtido pela distribuição F para nível de significância α de 5%, as variâncias desse nível de concentração poderiam ser consideradas iguais, ou seja, a matriz não tem efeito importante sobre a precisão do método nesse nível de fortificação i considerado. Nesse caso, os desvios-padrão desses dois grupos de análises podem ser agrupados e a igualdade das médias dos dois conjuntos de amostras pode ser testada com a distribuição t de Student pela comparação das médias de concentração do nível i .

Assim, nos casos em que as variâncias das amostras de analito em solvente puro e das amostras de analito em matriz foram equivalentes, fez-se o cálculo da variância agrupada conforme equação 10.

$$s^2 = \frac{(N_{x1}-1)s_{i1}^2 + (N_{x2}-1)s_{i2}^2}{(N_{x1}+N_{x2}-2)} \quad (10);$$

em que s^2 é a variância agrupada das amostras, n_{i1} e n_{i2} são o número de replicatas para cada nível de concentração.

O cálculo da estatística t é, então, aplicado por meio da equação 11:

$$t_{i,calc} = \frac{|\bar{x}_{i1} - \bar{x}_{i2}|}{\sqrt{s^2 \left(\frac{1}{n_{i1}} + \frac{1}{n_{i2}} \right)}} \quad (11) ;$$

em que \bar{x}_{i1} e \bar{x}_{i2} são as médias das concentrações dos analitos nas amostras com matriz e sem matriz ou vice-versa.

Já no caso em que as variâncias das concentrações de amostras de analito em solvente puro e amostras de analito em matriz foram diferentes (F calculado superior ao F crítico ao nível de significância de 5%), seguiu-se a equação 12. Neste caso, o valor tabelado de t é obtido a partir da tabela de distribuição de t de Student, tendo como graus de liberdade (v), o resultado da equação 13, e nível de significância α de 5%.

$$t_{b,calc} = \frac{|\bar{x}_{i1} - \bar{x}_{i2}|}{\sqrt{\frac{s_{i1}^2}{n_{i1}} + \frac{s_{i2}^2}{n_{i2}}}} \quad (12)$$

$$v = \frac{\left(\frac{s_{i1}^2}{n_{i1}} + \frac{s_{i2}^2}{n_{i2}} \right)^2}{\frac{\left(\frac{s_{i1}^2}{n_{i1}} \right)}{n_{i1}+1} + \frac{\left(\frac{s_{i2}^2}{n_{i2}} \right)}{n_{i2}+1}} - 2 \quad (13)$$

Se o valor de t calculado fosse menor que o t crítico, para o grau de liberdade definido e probabilidade de significância de 5%, se poderia concluir que a matriz não afeta o ensaio no i -ésimo nível de fortificação. Do contrário, se poderia concluir que a matriz tem um efeito estatisticamente significativo sobre o resultado. Para aceitação da não existência de efeito matriz, não deve haver efeito matriz em nenhum nível de concentração das fortificações.

5.3.2 Linearidade

Foram seguidos os procedimentos descritos em MAPA (2011).

5.3.2.1 Linearidade na análise de cerveja

O estudo de linearidade foi feito para CCEMBF. O preparo da curva de calibração encontra-se descrito no item 5.3.1.1.1. Foram feitos três preparos independentes da curva de calibração contendo seis níveis de concentração.

5.3.2.2 Linearidade na análise de glicerina e xaropes

O estudo de linearidade da curva de calibração de EG, DEG e MeOH em GLI e nos xaropes foi feito para CCAS. O preparo da curva de calibração encontra-se descrito na Tabela 6 do item 5.3.1.1.2. Foram feitos três preparos independentes da curva de calibração contendo seis níveis de concentração.

5.3.2.3 Linearidade na análise de propilenoglicol

O estudo de linearidade da curva de calibração de EG, DEG e MeOH em PPG foi feito para CCEMBF. O preparo da CCEMBF encontra-se descrito na Tabela 8 a seguir. Foram feitos três preparos independentes da curva de calibração contendo seis níveis de concentração.

Tabela 8 – Descrição do preparo da CCEMBF de EG, DEG e MeOH em PPG.

Nível de fortificação (mg L ⁻¹)	Concentração das SE individuais de EG, DEG e MeOH (mg L ⁻¹)	Concentração da SEMix (mg L ⁻¹)	Volume de SE PPG 50000 mg L ⁻¹ (mL)	Volume pipetado da SEMix (mL)	Volume final da STmix (mL)
1	10000	100	1,0	0,10	10
3				0,30	
5				0,05	
10		1000	1,0	0,10	
15				0,15	
20				0,20	

5.3.2.4 Tratamento estatístico da linearidade

Foram plotadas as respostas instrumentais *versus* a concentração dos analitos em um gráfico de dispersão. Para avaliação da linearidade, a curva de calibração foi construída utilizando a média das replicatas para cada nível de concentração

independente. As respostas instrumentais, para cada analito, foram as seguintes:

- EG: razão da área dos picos m/z 61 do EG e m/z 44 de 1,4-BuOH no caso das análises de cerveja e xarope; razão da área dos picos m/z 31 do EG e m/z 44 de 1,4-BuOH no caso das análises de GLI e PPG;
- DEG: razão da área do pico m/z 75 do DEG e m/z 44 de 1,4-BuOH em todos os casos;
- MeOH: razão da área do pico m/z 15 do MeOH e m/z 44 de 1,4-BuOH no caso das análises de GLI, PPG e xaropes.

Os níveis de concentração dos analitos empregados foram de 3, 5, 10, 20, 30 e 50 mg L⁻¹ para as análises de cerveja e de 1, 3, 5, 10, 15 e 20 mg L⁻¹ para as análises de GLI, PPG e xaropes. Cada nível de concentração (I = número de níveis de concentração) teve sua solução preparada três vezes (J = número de preparos de soluções independentes) e cada uma das soluções de calibração foi injetada em triplicata (L = número de injeções de uma solução) e de maneira aleatória. Isso resultou em um número total de leituras de resposta instrumental igual a 54 para a curva combinada, estando de acordo com o preconizado em MAPA (2011), que é de no mínimo 30.

A primeira etapa para o estudo de linearidade foi a observação visual das curvas de calibração, obtidas pelo emprego do Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO) e dos gráficos de resíduos.

Como premissa para aplicação dos métodos estatísticos, foi feita a avaliação da normalidade dos resíduos, empregando o teste de D'Agostino e Pearson, empregando o *software* GraphPad Prism versão 6.01, de 21 de setembro de 2012.

Para avaliação estatística da homocedasticidade dos resíduos foi empregado o teste F previsto em MAPA (2011), no qual se compara a maior variância ($s_{yi\ max}^2$) das respostas instrumentais com a menor variância ($s_{yi\ min}^2$) dentre todos os níveis. O cálculo da estatística F discriminante é:

$$F_{h,calculado} = \frac{s_{yi,max}^2}{s_{yi,min}^2} \quad (14)$$

na qual s_{yi} é o desvio padrão das respostas instrumentais independentes de cada i -ésimo nível de calibração.

Ao mesmo tempo, obtém-se, de uma tabela de teste F, o valor tabelado de F crítico com $J_{i,max}$ menos um graus de liberdade no numerador e $J_{i,min}$ menos um graus de liberdade no denominador, sendo que $J_{i,max}$ e $J_{i,min}$ são, respectivamente, o número de injeções do nível de calibração com a maior variância e o número de injeções do nível de calibração com a menor variância. Foi adotado nível de significância α de 5%.

Foi feito o teste de independência de resíduos empregando a estatística de Durbin-Watson ao nível de significância de 5%, por meio do *software* Minitab 2023. Este teste determina se a correlação entre os resíduos adjacentes é zero.

A avaliação da presença de pontos aberrantes, extremos ou *outliers* foi feita empregando-se a estatística t , conforme definido em MAPA (2011), empregando a seguinte equação:

$$t_{y_{ijl},calculado} = \frac{|e_{y_{ijl}}|}{s_{res,yi}} \quad (15)$$

na qual:

$|e_{y_{ijl}}| = \text{resíduo} = y_{ijl, \text{ medido}} - y_{ijl, \text{ calculado}}$;

$s_{res,yi}$ é o desvio padrão amostral dos desvios das respostas instrumentais do i -ésimo nível de concentração calculados pela equação a seguir:

$$s_{res,yi} = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^J \sum_{l=1}^L (y_{ijl} - \hat{y}_i)^2}{J \times L - 1}} \quad (16)$$

em que y_{ijl} é a resposta instrumental medida e \hat{y}_i é a resposta instrumental estimada pelo MMQP.

Se o valor de $t_{y_{ijl},calculado}$ para um ponto duvidoso de uma curva de calibração for menor ou igual ao valor de $t_{crítico}$ bilateral, para o nível de significância α de

5% e (JxL-1) graus de liberdade, considera-se que o ponto pertence à curva e a faixa até ele é linear.

Foi feita, então, a estimativa dos parâmetros de regressão das curvas de calibração foram estimados pelo Método dos Mínimos Quadrados Ponderados (MMQP) conforme equação a seguir:

$$\hat{y}_i = a_w + b_w \times x_i \quad (17)$$

na qual:

\hat{y}_i é a variável dependente, ou seja, a resposta instrumental estimada pela equação de regressão do MMQP no i -ésimo nível de concentração;

a_w é a estimativa da intersecção a de MMQP;

b_w é a estimativa da inclinação b de MMQP;

x_i é a variável independente

Para definição do peso de ponderação, w_i , foi empregada a seguinte equação:

$$w_i = \frac{\bar{s}_{y_i}^2}{s_{y_i}^2} \quad (18)$$

em que $\bar{s}_{y_i}^2$ é a média das variâncias de todos os níveis e $s_{y_i}^2$ é a variância do nível.

A equação para os cálculos dos coeficientes de regressão são:

$$b_w = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \sum_{j=1}^J w_i x_i \bar{y}_{ij} - \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \bar{y}_{ij}}{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \sum_{j=1}^J w_i x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i \right)^2} \quad (19)$$

$$a_w = \bar{y}_w - b_w \bar{x}_w = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i^2 \sum_{j=1}^J w_i \bar{y}_{ij} - \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i \bar{y}_{ij}}{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \sum_{j=1}^J w_i x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i \right)^2} \quad (20)$$

em que \bar{y}_{ij} é a resposta instrumental média do nível;

Foi feito o cálculo do coeficiente de correlação linear r_w pelo MMQP por meio da seguinte equação:

$$r_w = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \sum_{j=1}^J w_i x_i \bar{y}_{ij} - \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \bar{y}_{ij}}{\left[\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \sum_{j=1}^J w_i x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i \right)^2 \right]^{1/2} \times \left[\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \sum_{j=1}^J w_i \bar{y}_{ij}^2 - \left(\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \bar{y}_{ij} \right)^2 \right]^{1/2}} \quad (21)$$

O coeficiente de determinação (r_w^2), por sua vez, é o quadrado do coeficiente de correlação linear.

Para a avaliação estatística da linearidade, formula-se a hipótese nula (H_0) na qual o coeficiente de correlação linear r_w é estatisticamente igual a zero, ou seja, não há correlação entre y e x ; e a hipótese alternativa (H_1), em que r_w é estatisticamente diferente de zero.

Foi calculada, então, a estatística t_{r_w} com auxílio da seguinte equação:

$$t_{r_w} = \frac{|r_w| \sqrt{N_x - 2}}{\sqrt{1 - r_w^2}} \quad (22)$$

em que N_x é a multiplicação de I (número de níveis de calibração) por J (número de preparo de soluções independentes).

5.3.3 Efeito residual

Para avaliação do efeito residual ou *carryover*, foi empregada a metodologia descrita a seguir. Foi definida a RDC nº 27, de 17 de maio de 2012, da Anvisa, para definição do critério de aceitação dos resultados (BRASIL, 2012).

O estudo do efeito residual foi feito pela injeção em triplicata de uma curva de calibração, de acordo com um protocolo definido de sequência de injeção, na qual após injeção dos níveis 3, 5, 10 e 20 mg L⁻¹ foi injetada uma amostra de branco, composta por uma mistura de etanol e água 8:2 v/v. Já após a injeção dos níveis 30 e 50 mg L⁻¹, o branco foi injetado duas vezes sequenciais. O estudo foi feito com a CCAS e com a CCEMBF da cerveja. Os cromatogramas dos brancos foram, então, inspecionados quanto a presença persistente dos analitos e do PI, para verificação de efeito residual. No caso de detecção de sinais analíticos, os mesmos foram integrados para obtenção do valor de área.

Diferentemente do preconizado na RDC 27/2012 (BRASIL, 2012), o efeito residual foi estudado em uma ampla faixa da curva de calibração, não apenas

no limite superior da curva (LSC). Além disso, o número de injeções do branco foi aquele empregado na rotina de análise, de tal forma a verificar se essa quantidade de injeções de branco entre amostras era suficiente para evitar o efeito residual.

Os valores de área de picos que eluem no TR dos analitos, eventualmente presentes na injeção dos brancos, foram comparados em termos percentuais aos valores de área de picos obtidos para os mesmos analitos na injeção da amostra com concentração correspondente ao limite inferior da curva de calibração (LIC). Segundo RDC nº 27/2012, aceita-se efeito residual caso todos os picos interferentes no TR do analito forem inferiores a 20% da área dos analitos das amostras do LIC (BRASIL, 2012).

5.3.4 Exatidão e Precisão

A determinação da exatidão e da precisão foi conduzida conjuntamente por intermédio de matriz branca fortificada.

5.3.4.1 Execução do estudo de exatidão e precisão em cerveja

Para a condução dos estudos de exatidão e precisão, amostras de cervejas brancas, aliquotadas em 1,0 mL, foram fortificadas em três níveis de concentração (15, 25 e 250 mg L⁻¹) pela adição de volumes específicos de soluções padrões dos analitos (EG e DEG) diluídas em etanol, denominadas STmix. As amostras fortificadas foram submetidas ao procedimento padronizado de preparo de amostra de cerveja (item 6.2.1).

Adicionalmente, foi testada também a exatidão e precisão em amostras que necessitam de maior diluição para que sua concentração se situe dentro da faixa linear validada. Isso foi feito para englobar, na validação, as diluições adicionais que são necessárias no caso de amostras de cerveja contendo altas concentrações dos contaminantes. Para isso, mediu-se 1,0 mL de amostra de cerveja branca que foi fortificada no nível de concentração de 2.000 mg L⁻¹ pela adição de volume específico de STmix. A amostra foi submetida ao procedimento

padronizado de preparo de amostra de cerveja (item 6.2.1). Após centrifugação, fez-se uma segunda diluição da amostra em balao volumétrico, empregando etanol como diluente.

Para injeção no equipamento GC-MS, 1,0 mL da amostra de cerveja diluída foi transferido para um vial contendo 100 μL de solução de 1,4-BuOH 100 mg L^{-1} . Cada nível de fortificação foi feito em sextuplicata e o experimento foi repetido em três dias diferentes, atendendo ao preconizado em MAPA (2011).

A Tabela 9 apresenta em detalhes como foram feitas as fortificações e diluições desse estudo. O nível baixo, médio e alto refere-se à concentração das amostras no vial, e não na cerveja.

Tabela 9 – Protocolo de execução do estudo de exatidão e precisão de EG e DEG em cervejas.

Nível de fortificação (em relação à concentração final no vial)	Baixo		Médio	Alto
	Concentração validada na exatidão e precisão = Concentração no vial (mg L^{-1})	3	5	20
Volume de cerveja branca (mL)	1,0	1,0	1,0	1,0
Volume adicionado da STmix (mL)	0,06	0,10	0,20	0,10
Concentração de EG e DEG na STmix (mg L^{-1})	250	250	10000	2500
Concentração dos analitos na cerveja fortificada (mg L^{-1})	15	25	2000	250
Volume de etanol adicionado à cerveja (mL)	3,94	3,90	3,80	3,90
Volume pipetado da 1ª diluição para preparar a 2ª diluição (mL)	---	---	0,5	---
Volume final da 2ª diluição (mL)	---	---	10	---

5.3.4.2 Execução do estudo de exatidão e precisão em glicerina e propilenoglicol

Para a condução dos estudos de exatidão e precisão, fez-se a fortificação, em balões volumétricos de SE de GLI ou PPG, pela adição de volumes específicos de SEMix dos analitos (EG, DEG e MeOH) em três níveis de concentração (1, 10 e 20 mg L^{-1}). A tabela 10 a seguir detalha este procedimento.

Para injeção no equipamento GC-MS, 1,0 mL da amostra diluída foi transferido para vial contendo 100 μL de solução de 1,4-BuOH 100 mg L^{-1} . Cada nível de

fortificação foi feito em sextuplicata e o experimento foi repetido em três dias diferentes, atendendo ao preconizado em MAPA (2011).

Tabela 10 – Descrição do preparo das amostras fortificadas de GLI e PPG.

Nível de fortificação (mg L ⁻¹)	Concentração das SE individuais de EG, DEG e MeOH (mg L ⁻¹)	Concentração da SEMix (mg L ⁻¹)	Volume pipetado de SE PPG ou GLI 50000 mg L ⁻¹ (mL)	Volume pipetado da SEMix (mL)	Volume final da STmix (mL)
1	10000	100	1,0	0,10	10
10		1000	1,0	0,10	10
20			1,0	0,20	10

5.3.4.3 Execução do estudo de exatidão e precisão em xaropes

O preparo das amostras de xaropes fortificados foi feito conforme descrito a seguir. A balões volumétricos de 10 mL, adicionou-se 1,0 mL de xarope (amostra branca), 2,0 mL de água ultrapura, volume apropriado de SEMix (a depender da concentração das SEMix preparadas), e etanol em quantidade suficiente para completar o volume do balão, de forma a obter soluções dos analitos (EG, DEG e MeOH) nas concentrações 10, 100 ou 200 mg L⁻¹. Fez-se uma segunda diluição, transferindo-se 100 µL de cada balão para *vials* aos quais foram adicionados 900 µL de etanol e 100 µL de ST de 1,4-BuOH 100 mg L⁻¹, gerando soluções de xarope diluídas cem vezes e fortificadas com os analitos nas concentrações 1, 10 e 20 mg L⁻¹. Cada um dos três níveis de fortificação foi preparado em sextuplicata e o experimento foi repetido em três dias diferentes, atendendo ao preconizado em MAPA (2011).

5.3.4.4 Tratamento dos dados de exatidão e precisão

Para avaliação da exatidão, adotou-se o critério de aceitação descrito em MAPA (2015), no qual a diferença percentual entre a concentração teórica (nível de fortificação) e a concentração experimental (média dos resultados do estudo de exatidão) deve ser menor ou igual a 20%, conforme equação 23.

$$Diferença (\%) = \left[\frac{(Concentração\ experimental\ média - Concentração\ teórica)}{Concentração\ teórica} \right] \times 100 \quad (23)$$

Para avaliação da precisão, a partir dos dados de concentração obtidos, por nível de fortificação e por analito, foram calculados os desvios padrão relativos (DPR), que representam a expressão numérica para medida de precisão. A fórmula para o cálculo de DPR é a seguinte:

$$DPR (\%) = \frac{\text{desvio padrão das concentrações mensuradas}}{\text{média das concentrações mensuradas}} \times 100 \quad (24)$$

Adotou-se como critério de aceitação de precisão, o DPR de Horwitz. A equação 25 descreve o cálculo do DPR máximo de Horwitz (MAPA, 2015):

$$DPR_{\text{máximo}} = 2^{(1-0,5\log C)} \quad (25)$$

na qual C é a concentração do analito em fração de massa.

5.3.5 Limite de detecção e limite de quantificação

Para determinação experimental do limite de detecção (LD), definiu-se que este seria a menor concentração do analito em que fosse possível a observação do sinal analítico com relação S/R mínima de três para o íon *m/z* quantificador. Assim, empregando-se o processo de diluição das amostras, foram testadas amostras de cerveja, GLI, PPG e xaropes fortificadas em concentrações decrescentes dos analitos até que fosse atingida a condição estabelecida, em seis amostras independentes.

O limite de quantificação (LQ) foi definido como a menor concentração avaliada experimentalmente que apresentou resultados de exatidão e precisão satisfatórios.

5.3.6 Estudo de estabilidade

O estudo de estabilidade das soluções foi executado concorrentemente às análises de validação dos métodos analíticos. Nos momentos em que os sistemas de GC-MS não estavam ocupados com corridas analíticas das análises de validação, as amostras de estabilidade eram injetadas, o que foi o fator decisivo para os tempos empregados nos estudos de estabilidade das soluções.

Ou seja, os tempos do estudo de estabilidade estão relacionados à disponibilidade dos equipamentos de GC-MS. A temperatura empregada nos estudos de estabilidade foi aquela em que as soluções eram mantidas após o preparo, de forma a refletir a estabilidade em condições reais.

5.3.6.1 Estabilidade das soluções dos analitos em solvente

As SE e soluções de trabalho (ST) dos analitos foram armazenadas à temperatura ambiente, em frascos de vidro.

Foi estudada a estabilidade da STmix, armazenada à temperatura ambiente, de concentração 1 mg L⁻¹. Segundo MAPA (2011), caso o estudo de estabilidade seja feito em solução mais diluída, essa estabilidade pode ser considerada para as soluções mais concentradas, desde que ambas sejam armazenadas sob as mesmas condições.

A partir de uma mesma SEMix, foram feitas seis diluições a 1 mg L⁻¹ e esta foi analisada quando de seu preparo e após 106 horas, sendo a quantificação realizada com uma nova curva de calibração preparada no dia. As soluções foram mantidas à temperatura ambiente. A avaliação da estabilidade foi feita pela comparação da média dos valores de concentração estimados em cada tempo.

Foi também estudada a estabilidade da SEMix contendo EG e DEG na concentração 10.000 mg L⁻¹, armazenada à temperatura ambiente. Para isso, SEMix, preparadas em diferentes tempos, foram diluídas em etanol para a concentração de 30 mg L⁻¹ no mesmo dia, e injetadas no equipamento de GC-MS. Para avaliação da estabilidade foram utilizados os valores de razão de área do pico do íon quantificador do analito pela área do pico do íon *m/z* 44 do PI 1,4-BuOH, sendo este adicionado no dia da injeção das soluções. A avaliação da degradação foi feita por monitoramento do sinal analítico (razão de áreas), uma vez que este é proporcional à concentração. Além disso, os cromatogramas foram observados a fim de se verificar possível aparecimento de picos interferentes ou distorções nos formatos dos picos dos analitos.

Admite-se um padrão como estável quando for observada uma degradação máxima de até 5% em relação a uma referência recém-preparada, conforme preconizado em MAPA (2011).

5.3.6.2 Estabilidade do padrão interno

Foi estudada a estabilidade da ST contendo PI na concentração 100 mg L⁻¹. Para isso, ST preparadas em diferentes tempos, foram injetadas no mesmo dia no equipamento de GC-MS. As SE e ST do PI foram armazenadas em frascos de vidro e mantidas à temperatura ambiente.

A avaliação da degradação foi feita por monitoramento da área do pico do íon *m/z* 44 referente ao PI, uma vez que esta é proporcional à concentração. Os cromatogramas foram observados a fim de se verificar possível aparecimento de picos interferentes ou distorções nos formatos dos picos dos analitos.

5.3.6.3 Estabilidade das soluções diluídas de cerveja

A estabilidade das soluções diluídas de cerveja foi testada para os analitos EG e DEG por 56 horas. Foram preparadas seis amostras fortificadas no LQ que foram quantificadas frente a uma curva de calibração quando de seu preparo, após 24 horas e após 56 horas de espera no auto-injetor à temperatura ambiente. O número de amostras está de acordo com o preconizado em MAPA (2011).

Admite-se um padrão como estável quando for observada uma degradação máxima de até 5% em relação a uma referência recém-preparada, conforme preconizado em MAPA (2011).

5.4 Estimativa da incerteza de medição

A abordagem para estimativa da incerteza empregada neste trabalho foi a *bottom-up* que consiste na identificação e quantificação das fontes relevantes de incerteza (OLIVEIRA & AGUIAR, 2009; LA CRUZ *et al.*, 2010). Esta envolve

quatro etapas, quais sejam: a especificação do mensurando, a identificação das fontes de incerteza, a quantificação dos componentes de incerteza e o cálculo da incerteza padrão combinada (LA CRUZ *et al.*, 2010). Em adição, caso o laboratório opte por expressar a incerteza expandida, a incerteza padrão combinada é multiplicada por um fator denominado fator de abrangência (k), que estabelece um intervalo de confiança para a incerteza com base no nível de significância adotado, geralmente de 5%.

Como primeira etapa do processo de estimativa de incerteza de medição, foi feita a especificação do mensurando, que é a concentração de EG, DEG ou MeOH na matriz analisada, sendo dada pela seguinte equação (Equação 26):

$$C = \left(\frac{RI-a}{b} \times \frac{V_{F1}}{V_{I1} \text{ ou } m_a} \times \frac{V_{F2}}{V_{I2}} \right) \times FC_{Rec} + C_{PI} \quad (26)$$

na qual:

C é a concentração do analito;

RI é a resposta instrumental, neste caso a razão da área do pico do íon quantificador do analito (EG, DEG ou MeOH) pela área do pico do PI;

V_{F1} é o volume final da primeira diluição empregada na amostra;

V_{I1} é o volume inicial da primeira diluição (volume da amostra), para o caso das análises de cervejas ou xaropes; m_a é a massa da amostra, para o caso das análises de GLI ou PPG;

V_{F2} é o volume final da segunda diluição (caso seja necessária);

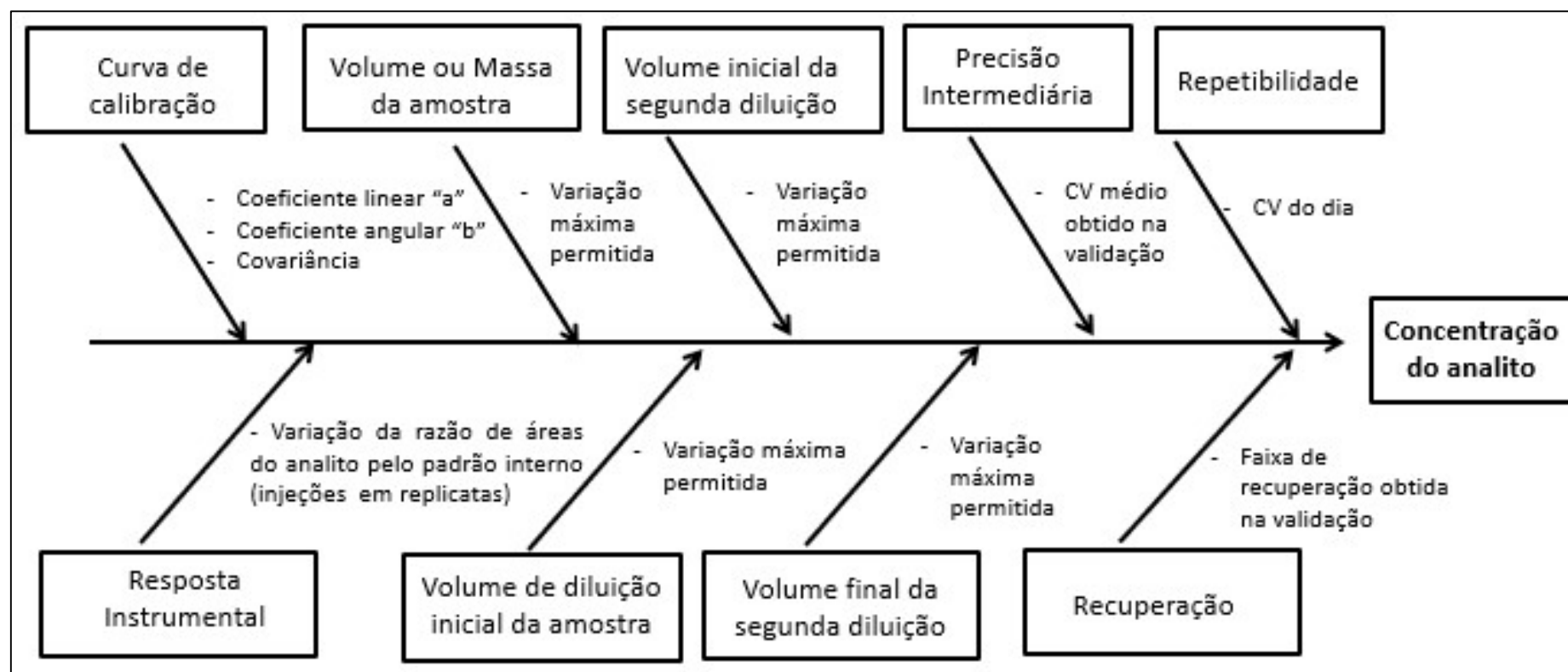
V_{I2} é o volume inicial da segunda diluição (caso seja necessária);

FC_{Rec} é o fator de correção da recuperação;

C_{PI} é a correção devido à precisão intermediária.

Em seguida, partiu-se para a próxima etapa do processo de incerteza de medição, que é a identificação das fontes de incerteza, fazendo uso do Diagrama de Ishikawa ou Diagrama de Causa e Efeito (Figura 5).

Figura 5 – Diagrama de Ishikawa para determinação das fontes de incerteza do método analítico de determinação da concentração de EG, DEG e MeOH nas diversas matrizes.



Fonte: elaborado pela autora (2023)

As fontes de incerteza identificadas para o método foram: estimativa dos parâmetros da regressão linear, medição do volume ou massa da amostra; medições de volume para realização da diluição ou diluições da amostra, variação instrumental das áreas dos picos dos analitos e do PI, incerteza devido à ausência de correção do resultado de concentração do analito pela sua recuperação, repetibilidade e precisão intermediária.

Na terceira etapa, foram estimadas as componentes de incerteza ($u(x_i)$) de cada fonte de incerteza identificada na etapa anterior. A incerteza de medição associada às estimativas de entrada é avaliada de acordo com os métodos de avaliação do tipo A ou do tipo B. A avaliação do tipo A da incerteza padrão é o método de avaliação da incerteza pela análise estatística de uma série de observações, sendo a incerteza padrão, o desvio padrão experimental da média. A avaliação do tipo B da incerteza padrão é o método de avaliação da incerteza por outros meios que não a análise estatística de uma série de observações, sendo baseada em algum outro conhecimento científico (KRONENBERG, 2007).

Para as fontes de incerteza do tipo A assume-se que a distribuição de probabilidade dos dados segue um comportamento normal. Para as fontes de incerteza do tipo B, assume-se que há pouca informação disponível e, por isso, se supõe *a priori* uma distribuição simétrica retangular (ISO GUM, 2008).

Para a regressão linear (fonte de incerteza tipo A), temos três fatores que contribuem para a incerteza que são o coeficiente linear ou intercepto (a), coeficiente angular ou inclinação (b) e a covariância entre y e x ($cov(y,x)$). Como as grandezas y e x são mutuamente dependentes, sua covariância deve ser levada em consideração como uma contribuição à incerteza.

As componentes de incerteza dos coeficientes linear e angular são os seus desvios padrões obtidos por injeções replicatas dos pontos da curva. Por se tratar de distribuição normal, o divisor para obtenção da incerteza padrão, nestes dois casos, é 1.

Para a incerteza devido à resposta instrumental (fonte de incerteza tipo A), adotou-se o desvio padrão entre as respostas instrumentais obtidas por injeções

replicadas da mesma amostra como componente de incerteza e, novamente por se tratar de distribuição normal, o divisor empregado é 1.

Para a incerteza devido à medição de volume nas diluições (fonte de incerteza tipo B), empregou-se, como componente de incerteza, a variação máxima de volume permitida da vidraria ou a micropipeta empregada. Da mesma forma, para a incerteza devido à medição de massa (fonte de incerteza tipo B), empregou-se a variação máxima de massa permitida para a balança analítica empregada. Os critérios de variação máxima adotados pelo laboratório, de acordo com o equipamento empregado, encontram-se documentados e são estabelecidos após análise crítica, de forma a permitir uma variação aceitável dos resultados. A distribuição assumida é a retangular, sendo o divisor $\sqrt{3}$.

Como componente de incerteza devido à não correção do resultado pela recuperação (fonte de incerteza tipo B), empregou-se a equação descrita em CARVALHO *et al.* (2012) (Equação 27) e divisor $\sqrt{3}$.

$$u(FC_{rec}) = \frac{FC_{max} - FC_{min}}{2 \times FC_{medio}^2} \quad (27)$$

na qual: FC_{max} é o fator de correção máximo aceitável, FC_{min} é o fator de correção mínimo aceitável e REC_{media} é o valor média de recuperação aceitável. No presente modelo, aceitam-se recuperações entre 80 e 120%, logo FC_{max} é 1,2; FC_{min} é 0,8 e FC_{medio} é 1,0.

Como componente de incerteza devido à precisão intermediária (incerteza tipo A) foi definida o maior desvio padrão obtido nos estudos de precisão intermediária, para cada analito. A distribuição é normal, logo o divisor é 1. Já como componente de incerteza devido à repetibilidade (incerteza tipo A) foi empregado o desvio padrão obtido no dia da análise e o divisor é 1.

Na quarta etapa do processo de estimativa de incerteza, as incertezas associadas, que estão expressas como incertezas padrão, são somadas para a obtenção de uma incerteza padrão combinada. Para isso foram seguidas as etapas descritas a seguir.

Cada uma das componentes de incerteza foi multiplicada, quando aplicável, pelo coeficiente de sensibilidade ($c_i(x_i)$), gerando as chamadas contribuições de incerteza ($u_{xi}(y)$) conforme Equação 28.

$$u_{xi}(y) = u(x_i) \times c_i(x_i) \quad (28)$$

O coeficiente de sensibilidade é calculado pelas derivadas parciais da concentração do analito por cada uma das fontes de incerteza. O seu significado prático deve ser interpretado pela magnitude de influência de cada fonte de incerteza na concentração do analito. Além disso, sua outra função é fazer com que todas as contribuições de incerteza estejam na mesma unidade de medida do mensurando para que possam ser combinadas ao final. A seguir constam as equações dos coeficientes de sensibilidade para as diversas fontes de incerteza (Equações 29 a 36). Para a precisão intermediária e repetibilidade, o coeficiente de sensibilidade é 1.

$$\frac{\partial C}{\partial a} = - \frac{V_{F1} \times V_{F2} \times FC_{REC}}{b \times V_{I1} \times V_{I2}} \quad \text{ou} \quad \frac{\partial C}{\partial a} = - \frac{V_{F1} \times V_{F2} \times FC_{REC}}{b \times m_a \times V_{I2}} \quad (29)$$

$$\frac{\partial C}{\partial b} = \frac{V_{F1} \times V_{F2} \times FC_{REC}}{V_{I1} \times V_{I2}} \times \left(\frac{a-RI}{b^2} \right) \quad \text{ou} \quad \frac{\partial C}{\partial b} = \frac{V_{F1} \times V_{F2} \times FC_{REC}}{m_a \times V_{I2}} \times \left(\frac{a-RI}{b^2} \right) \quad (30)$$

$$\frac{\partial C}{\partial RI} = \frac{V_{F1} \times V_{F2} \times FC_{REC}}{b \times V_{I1} \times V_{I2}} \quad \text{ou} \quad \frac{\partial C}{\partial RI} = \frac{V_{F1} \times V_{F2} \times FC_{REC}}{b \times m_a \times V_{I2}} \quad (31)$$

$$\frac{\partial C}{\partial V_{I1}} = \frac{V_{F1} \times V_{F2} \times FC_{REC} \times (a-RI)}{b \times V_{I1}^2 \times V_{I2}} \quad \text{ou} \quad \frac{\partial C}{\partial m_a} = \frac{V_{F1} \times V_{F2} \times FC_{REC} \times (a-RI)}{b \times m_a^2 \times V_{I2}} \quad (32)$$

$$\frac{\partial C}{\partial V_{I2}} = \frac{V_{F1} \times V_{F2} \times FC_{REC} \times (a-RI)}{b \times V_{I1} \times V_{I2}^2} \quad \text{ou} \quad \frac{\partial C}{\partial V_{I2}} = \frac{V_{F1} \times V_{F2} \times FC_{REC} \times (a-RI)}{b \times m_a \times V_{I2}^2} \quad (33)$$

$$\frac{\partial C}{\partial V_{F1}} = \frac{V_{F2} \times FC_{REC} \times (RI-a)}{b \times V_{I1} \times V_{I2}} \quad \text{ou} \quad \frac{\partial C}{\partial V_{F1}} = \frac{V_{F2} \times FC_{REC} \times (RI-a)}{b \times m_a \times V_{I2}} \quad (34)$$

$$\frac{\partial C}{\partial V_{F2}} = \frac{V_{F1} \times FC_{REC} \times (RI-a)}{b \times V_{I1} \times V_{I2}} \quad \text{ou} \quad \frac{\partial C}{\partial V_{F2}} = \frac{V_{F1} \times FC_{REC} \times (RI-a)}{b \times m_a \times V_{I2}} \quad (35)$$

$$\frac{\partial C}{\partial FC_{REC}} = \frac{(RI-a)}{b} \times \frac{V_{F1}}{V_{I1}} \times \frac{V_{F2}}{V_{I2}} \quad \text{ou} \quad \frac{\partial C}{\partial FC_{REC}} = \frac{(RI-a)}{b} \times \frac{V_{F1}}{m_a} \times \frac{V_{F2}}{V_{I2}} \quad (36)$$

A combinação de todas as contribuições de incerteza é feita conforme Equação 37, gerando a incerteza padrão combinada (CABRAL, 2004).

$$u_c(y) = \sum_{i=1}^N \sqrt{(u(x_i) \times c_i(x_i))^2 + 2 \times c_a \times c_b \times cov(a_w, b_w)} \quad (37)$$

Segundo MAPA (2011) a covariância entre a e b pode ser obtida pela seguinte equação:

$$cov(a_w, b_w) = - \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i}{S_{xxw}} \times \frac{\sum_{i=1}^I s_{yi}^2}{I} \quad (38)$$

Sendo $\sum_{i=1}^I s_{yi}^2$ o somatório das variâncias das respostas instrumentais e S_{xxw} obtido pela equação 39.

$$S_{xxw} = \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i \right)^2 \quad (39)$$

Neste estudo, fez-se a opção por expressar a incerteza como incerteza padrão expandida. Assim, foi feito o cálculo do grau de liberdade efetivo (v_{eff}), a partir da incerteza padrão combinada ($u_c(y)$), das contribuições de incerteza ($u_{xi}(y)^4$) e do grau de liberdade de cada componente de incerteza (v_i) (Equação 40). O grau de liberdade efetivo é empregado para definição do fator de abrangência k, que é o valor t definido a partir da distribuição t de *Student*, ao nível de significância de 5%, e considerando, como número de graus de liberdade, o v_{eff} calculado. O fator de abrangência é, então, multiplicado pela incerteza padrão combinada gerando a incerteza padrão expandida (U) (Equação 41).

$$v_{eff} = \frac{u_c(y)^4}{\sum_{i=1}^N (u_{xi}(y)^4 / v_i)} \quad (40)$$

$$U = k_{(v_{eff}; 95\%)} \times u_c(y) \quad (41)$$

Os dados de análise das amostras fortificadas na concentração do LQ foram transferidos para as planilhas de cálculos e tiveram sua incerteza determinada. Para isso, a partir dos dados de concentração e incerteza expandida das amostras fortificadas no menor nível da curva de calibração (3 mg L⁻¹ na solução injetada no equipamento ou 15 mg L⁻¹ na amostra de cerveja; 1 mg L⁻¹ na solução injetada no equipamento ou 100 mg L⁻¹ na amostra de xarope; 1 mg L⁻¹ na solução injetada no equipamento ou 200 mg Kg⁻¹ na amostra de GLI ou PPG),

obtidas nos estudos de precisão e exatidão, foram obtidas as incertezas percentuais.

5.5 Análises de amostras de cerveja

O método analítico desenvolvido e validado foi empregado na análise de EG e DEG em 701 amostras de cerveja coletadas pelo MAPA, compreendendo 125 diferentes marcas, descritas no item 4.2.1 e Apêndice A. Das amostras coletadas, 87% delas (612 amostras distribuídas em 42 marcas) corresponderam a apenas um fabricante de cerveja alvo de investigação.

5.6 Análises de amostras de xarope

O método analítico desenvolvido e validado foi empregado na análise de EG, DEG e MeOH em 36 amostras - compreendendo xaropes farmacêuticos, soluções, suspensões e emulsões orais - descritas no item 4.2.2 e Apêndice B.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Otimização das condições instrumentais

Levando-se em consideração as propriedades físico-químicas dos analitos e suas concentrações nas amostras, a complexidade das matrizes e a busca de métodos de análise na literatura para determinação de álcoois tóxicos, fez-se a escolha pela técnica de GC-MS para o desenvolvimento dos métodos analíticos deste trabalho. A escolha por esta técnica decorre de suas características de alta seletividade e alta detectabilidade, sendo muito empregada na determinação de contaminantes em matrizes complexas e sendo, ainda, particularmente adequada para compostos voláteis e semi-voláteis.

O objetivo de empregar a padronização interna foi reduzir a interferência das flutuações dos sinais analíticos decorrentes da variação instrumental. Para escolha do PI, os seguintes fatores foram considerados: o pico cromatográfico referente a este composto deveria eluir na faixa de tempo de retenção dos picos cromatográficos dos analitos e estar bem resolvido em relação a eles, bem como deveria estar bem resolvido em relação aos picos dos demais componentes da amostra; o PI deveria ser altamente puro, não deveria reagir com nenhum dos componentes da amostras e deveria ser quimicamente similar aos analitos de interesse. O 1,4-BuOH reunia todas essas características desejáveis e foi, então, eleito como o PI dos métodos de análise desenvolvidos.

Os resultados obtidos nas etapas iniciais do estudo estão apresentados a seguir. Os cromatogramas constam nas Figuras 6 a 8 e os espectros de massas, nas Figuras 9 a 11, a seguir. A presença de picos em tempos de retenção (TR) distintos e bem resolvidos, bem como a comparação dos espectros de massas experimentais dos padrões aos de referência, presentes em biblioteca de espectros de MS, base do *National Institute of Standards and Technology* (Nist), permitiram a confirmação da identidade e da pureza dos padrões empregados na validação do método.

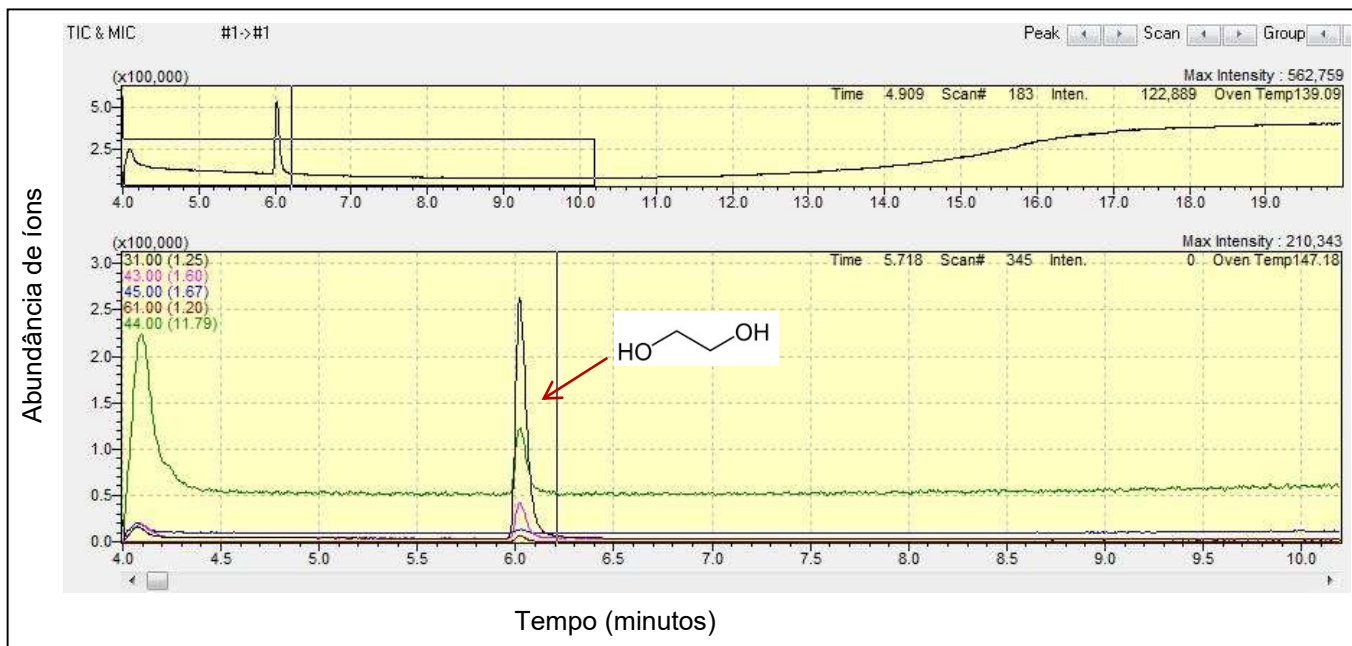
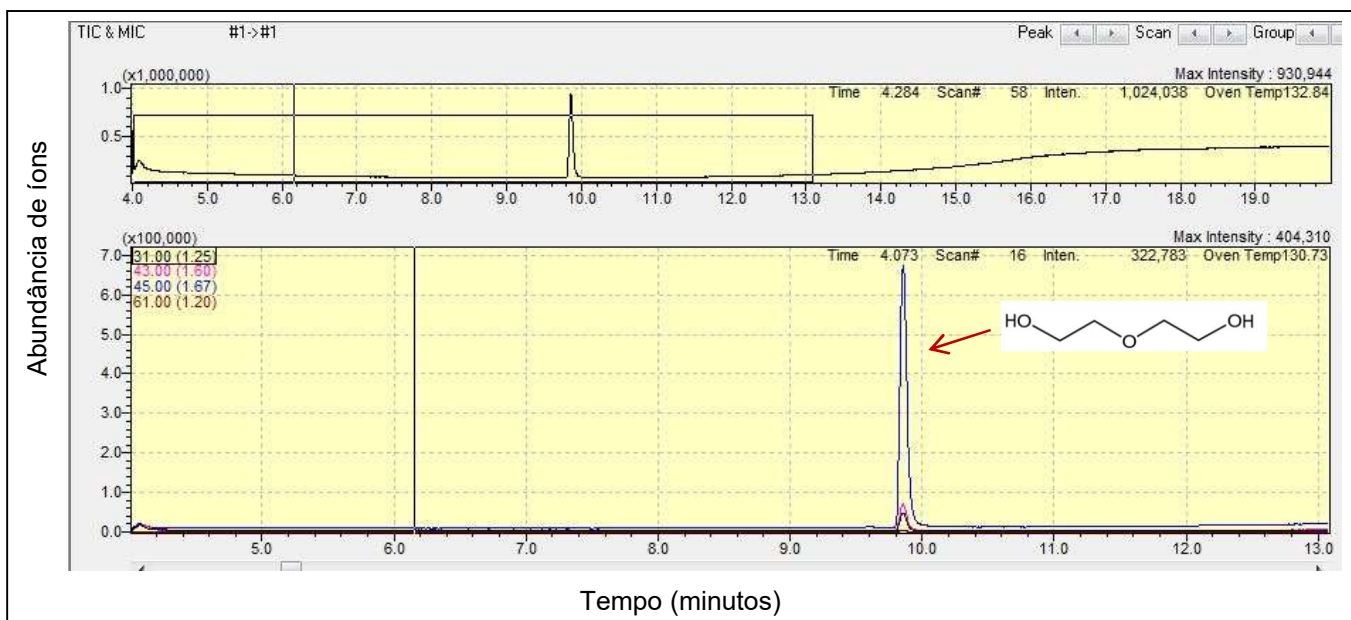
Figura 6 – Cromatograma de solução padrão de EG 100 mg L⁻¹ em etanol.Figura 7 – Cromatograma de solução padrão de DEG 100 mg L⁻¹ em etanol.

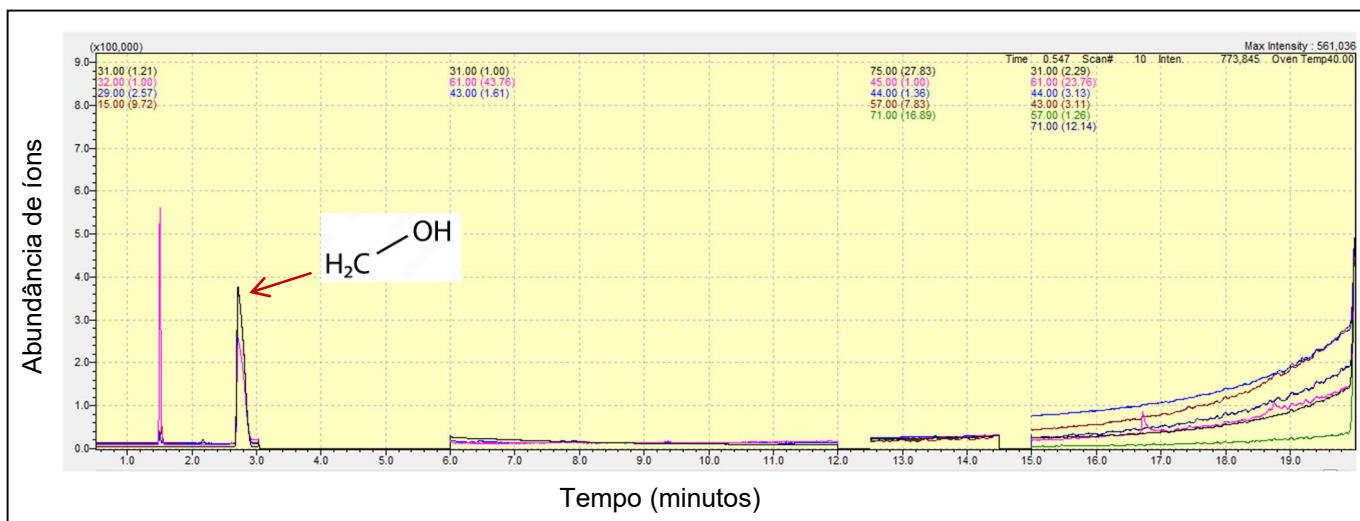
Figura 8 – Cromatograma de solução padrão de MeOH 20 mg L⁻¹ em etanol.

Figura 9 – Espectro de massas (intensidade de íons *versus* m/z) de solução padrão de EG 100 mg L⁻¹ seguido do espectro de massas de EG em biblioteca de GC-MS obtido por análise de similaridade estrutural.

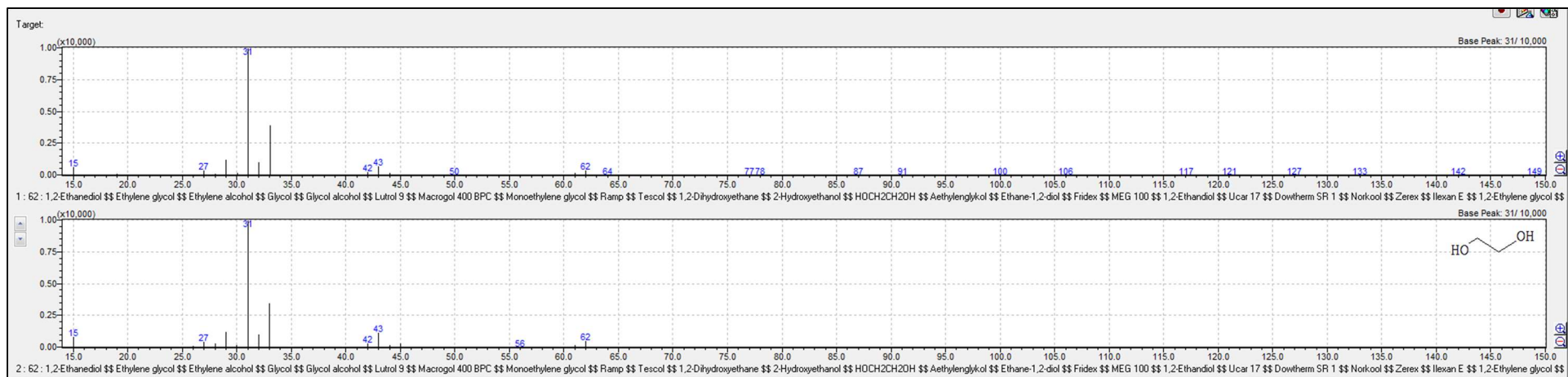


Figura 10 – Espectro de massas (intensidade de íons *versus* m/z) de solução padrão de DEG 100 mg L⁻¹ seguido do espectro de massas de DEG em biblioteca de GC-MS obtido por análise de similaridade estrutural.

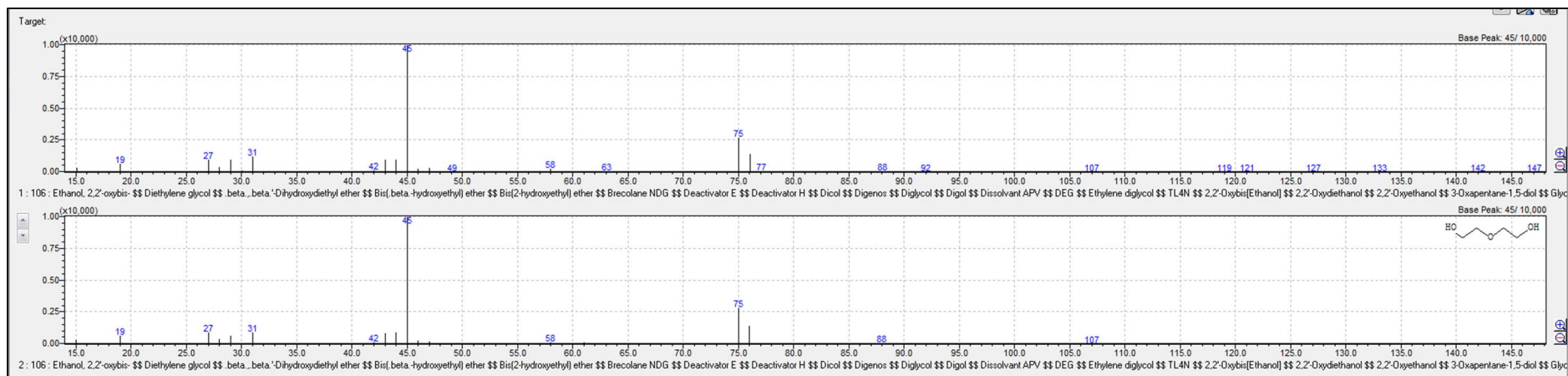
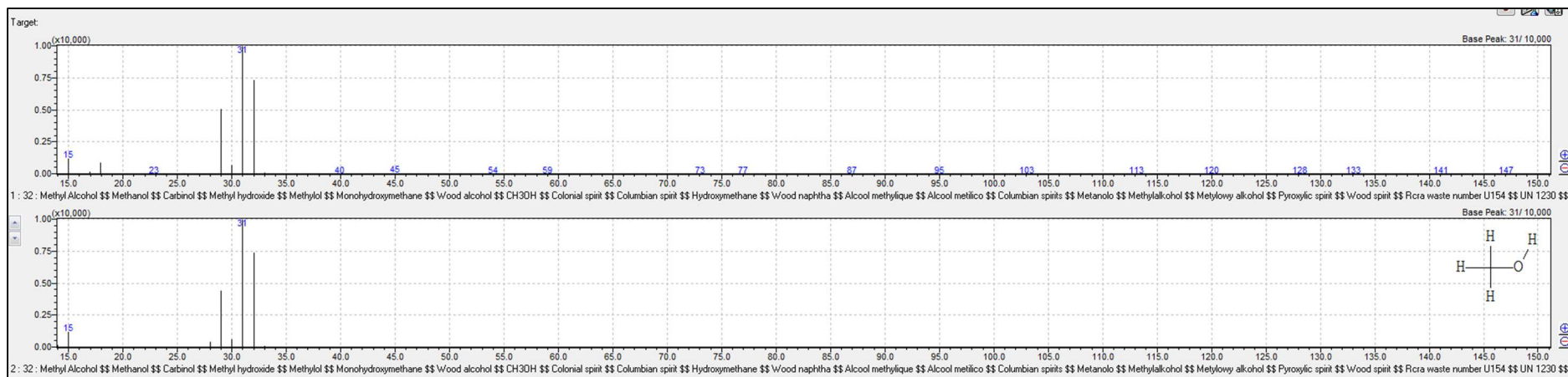


Figura 11 – Espectro de massas (intensidade de íons *versus* *m/z*) de solução padrão de MeOH 20 mg L⁻¹ seguido do espectro de massas de DEG em biblioteca de GC-MS obtido por análise de similaridade estrutural.



Com base nas Figuras 9, 10 e 11, fez-se a seleção dos íons monitorados para cada analito. Os íons monitorados foram os de *m/z* 61, 43 e 31 para EG; *m/z* 75 e 45 para DEG; *m/z* 15, 29, 31 e 32 para MeOH; e 44, 57 e 71 para 1,4-BuOH. Os íons quantificadores foram *m/z* 61 para EG em cerveja e em xaropes; *m/z* 31 para EG em GLI e PPG; *m/z* 75 para DEG em todas as matrizes; *m/z* 15 para MeOH em GLI, PPG e xaropes; e *m/z* 44 para 1-4-BuOH em todas as matrizes.

As Figuras 12 a 14 apresentam os espectros de massa de referência de EG, DEG e MeOH com a proposta das possíveis estruturas dos principais íons precursores e íons fragmentos.

Figura 12 – Espectro de massas de EG na biblioteca NIST.

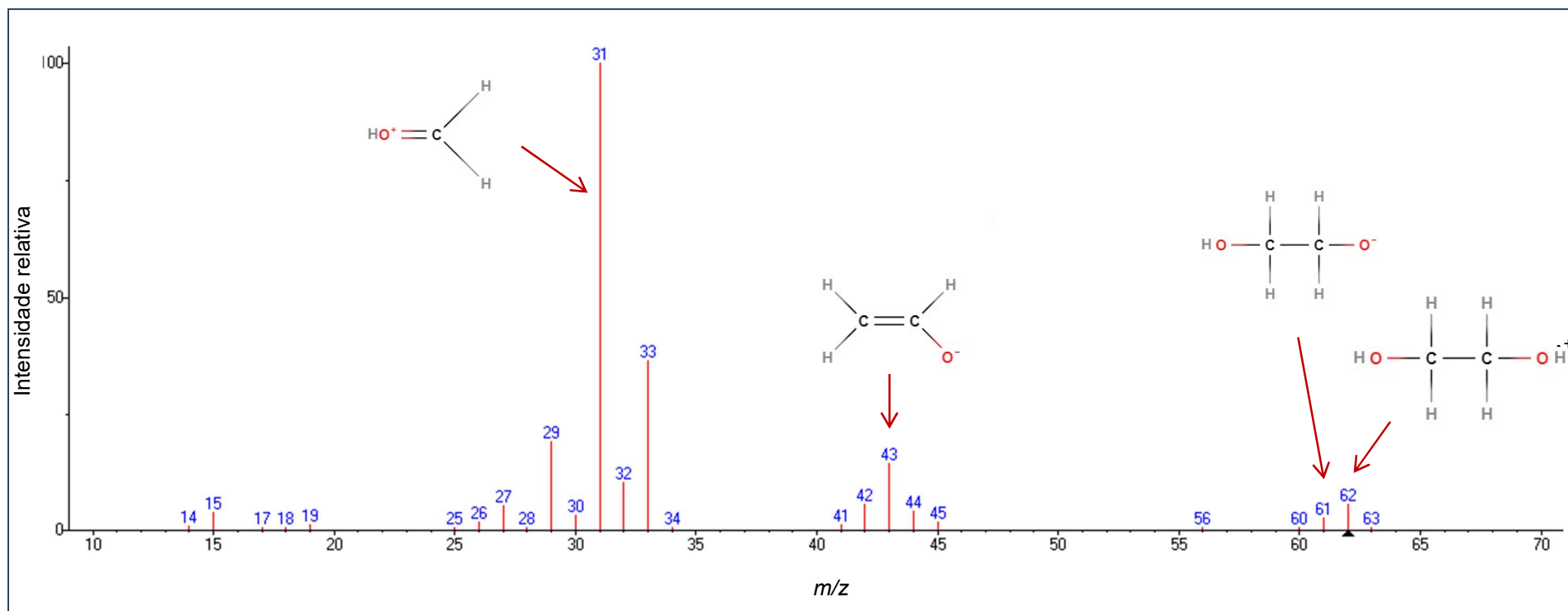


Figura 13 – Espectro de massas de DEG na biblioteca NIST.

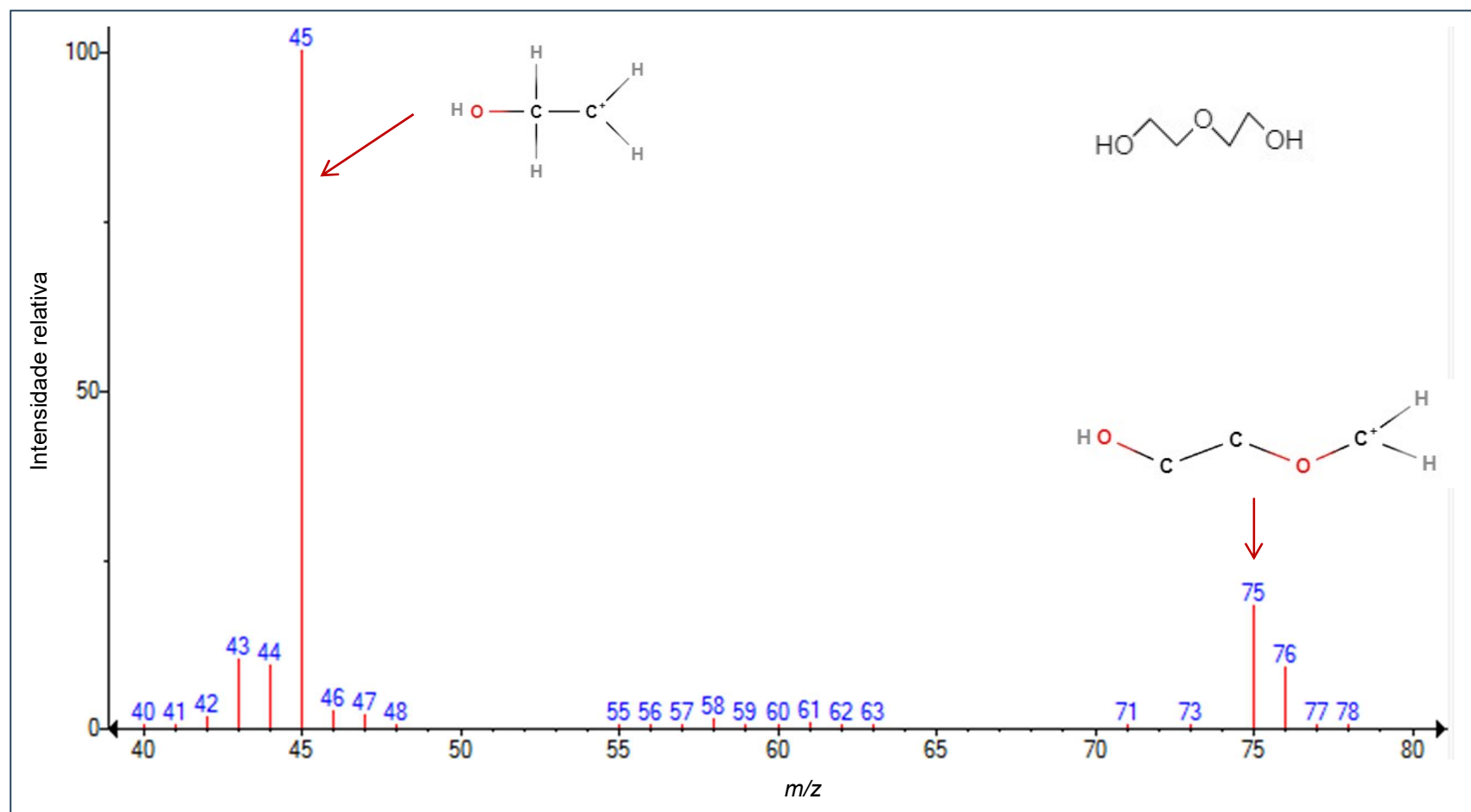
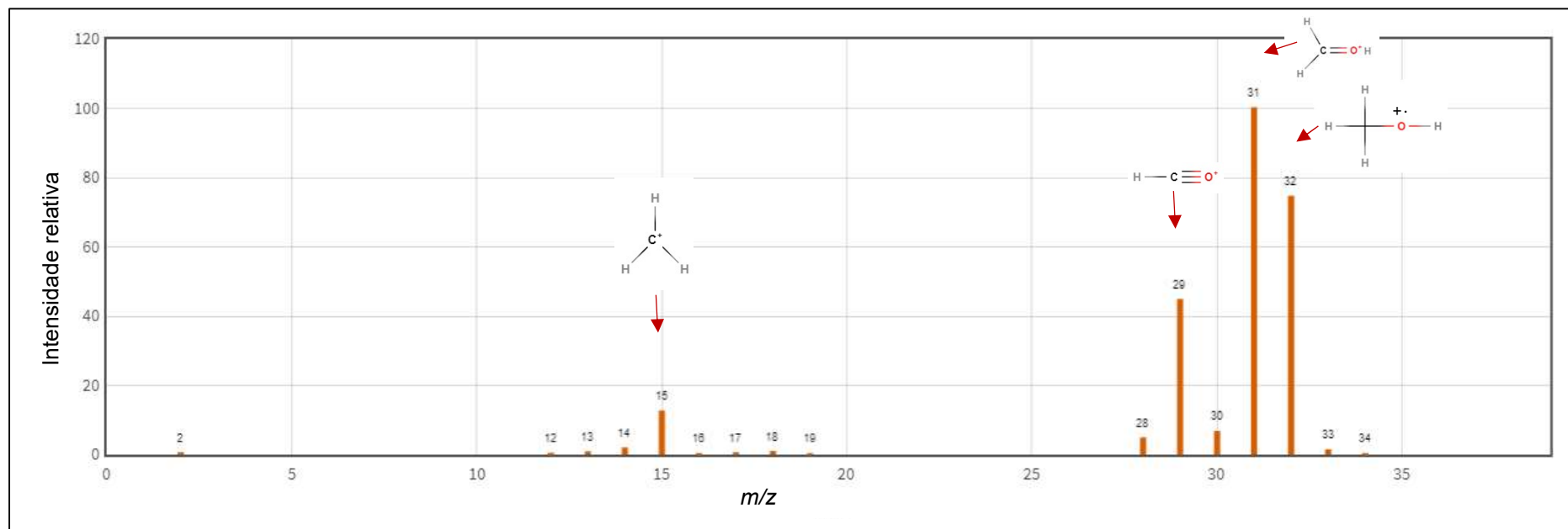


Figura 14 – Espectro de massas de MeOH na biblioteca NIST.



Os cromatogramas obtidos após otimização das condições experimentais para os métodos desenvolvidos constam nas Figuras 15 a 18 a seguir.

Figura 15 – Cromatograma de cerveja (abundância de íons *versus* tempo) fortificada com os analitos EG, DEG e PI em concentração 10 mg L⁻¹

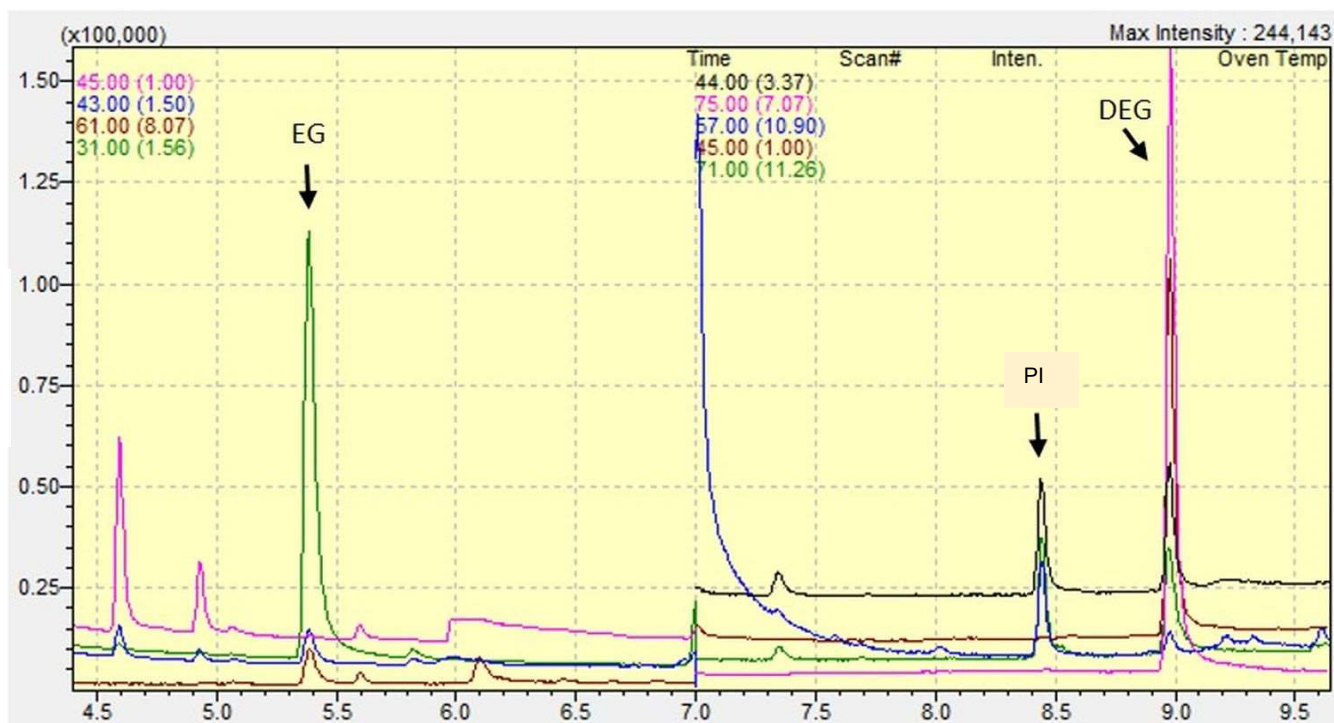


Figura 16 – Cromatograma de GLI (abundância de íons *versus* tempo) 5.000 mg L⁻¹ fortificado com os analitos EG, DEG, MeOH e PI em concentração 10 mg L⁻¹,

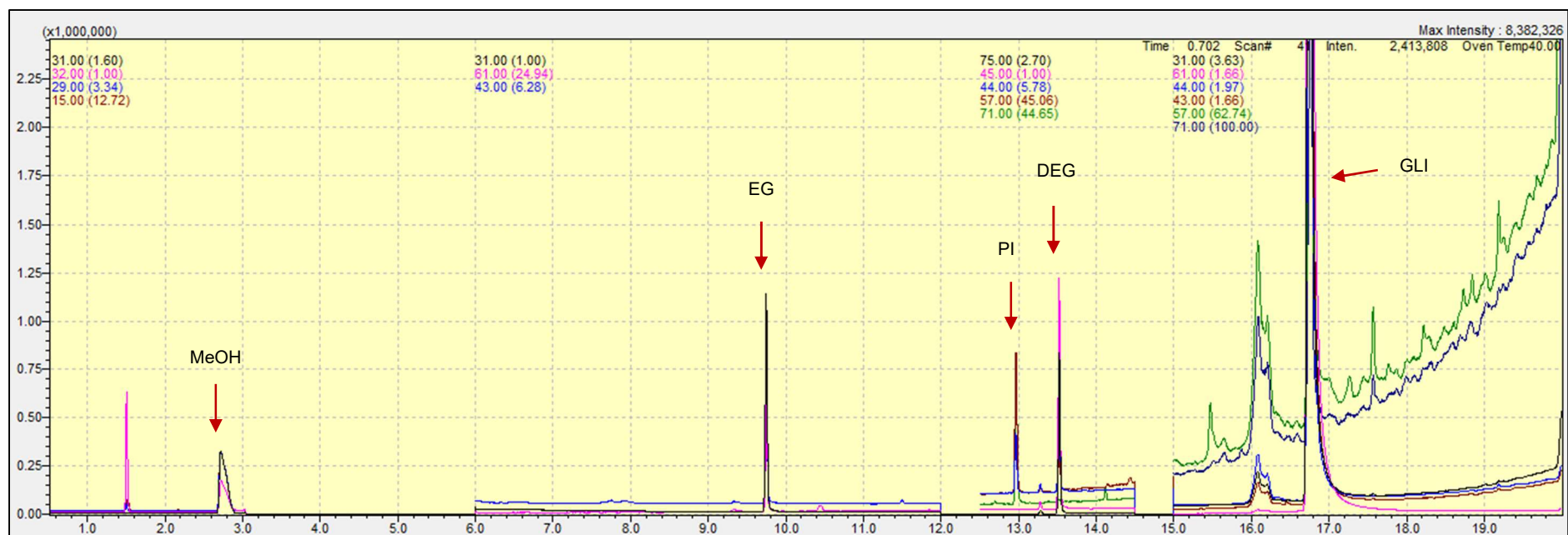


Figura 17 – Cromatograma de PPG (abundância de íons versus tempo) 5.000 mg L⁻¹ fortificado com os analitos EG, DEG, MeOH e PI em concentração 10 mg L⁻¹.

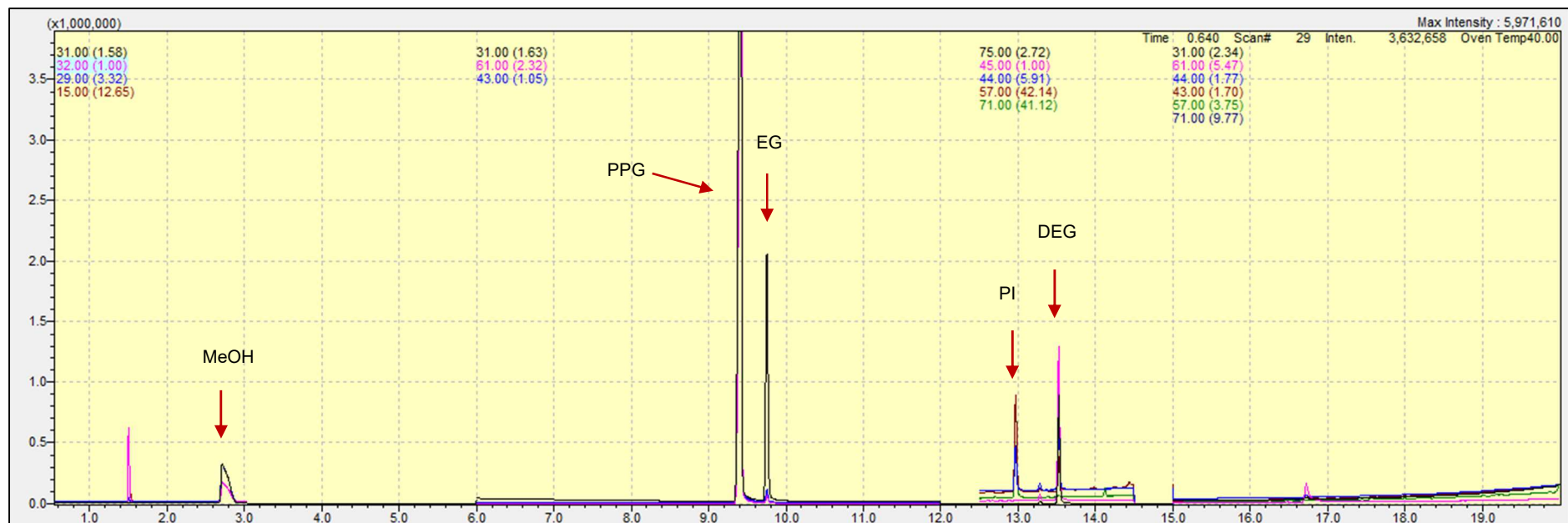
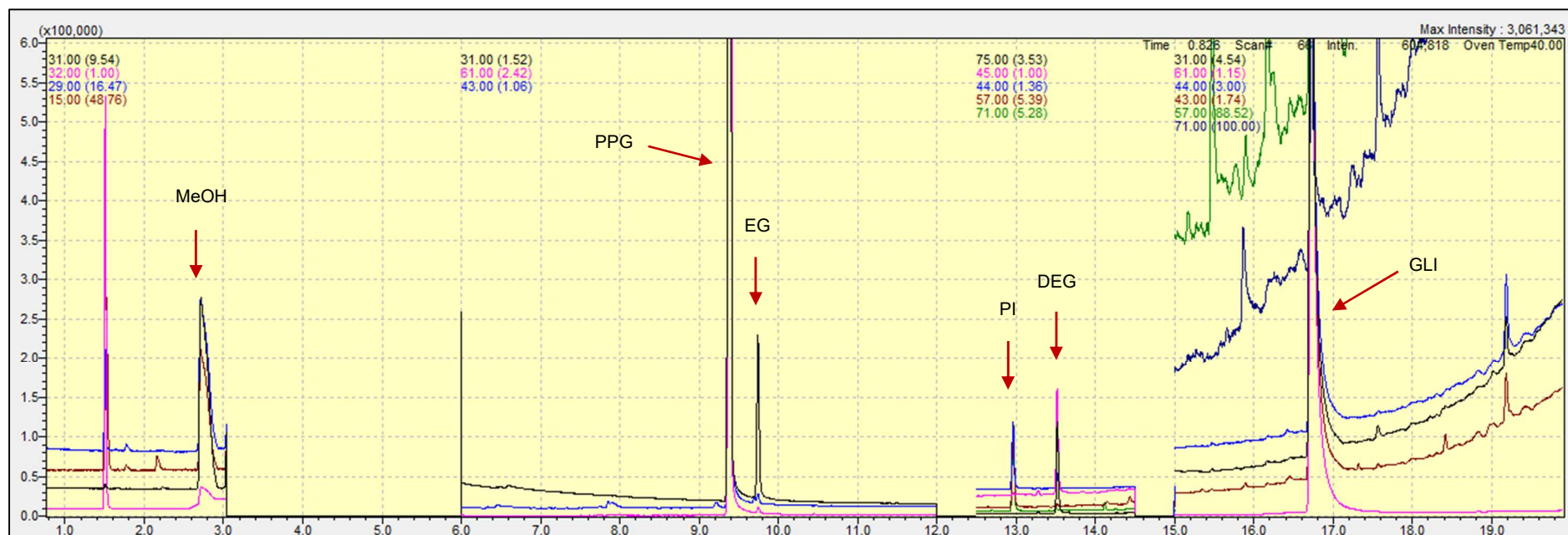


Figura 18 – Cromatograma de xarope (abundância de íons versus tempo) fortificado a 10 mg L⁻¹ com EG, DEG, MeOH e PI.



Os TR aproximados dos analitos foram:

- 5,4 min; 9,0 min e 8,45 min para EG, DEG e 1,4-BuOH, respectivamente, nas análises de cerveja;
- 2,6 min; 9,7 min; 13,5 min e 12,9 min para MeOH, EG, DEG e 1,4-BuOH, respectivamente, nas análises de GLI, PPG e xaropes.

A diferença nos TR de EG, DEG e 1,4-BuOH para o método desenvolvido para análises de cervejas em relação aos métodos para análise de GLI, PPG e xaropes deve-se principalmente às diferentes rampas de aquecimento da coluna cromatográfica. Diversos fatores justificam o aumento mais gradual de temperatura para o método instrumental de GLI, PPG e xaropes. Primeiro, este método inclui o analito MeOH, o que levou à necessidade de alterar a taxa de aquecimento no início da corrida. Segundo, para análise de PPG e de xaropes contendo este excipiente, há necessidade de uma melhor separação de PPG e EG, haja vista a concentração de PPG ser relativamente alta em relação à de EG, o que não ocorre nas cervejas. Por fim, para análise de GLI e xaropes contendo este excipiente é interessante a visualização do pico de GLI, logo fez-se necessário alterar a taxa de aquecimento ao fim da corrida, pois a GLI elui em TR maior em relação aos demais analitos.

O TR pode sofrer ligeiros deslocamentos em diferentes dias de análise, em decorrência da variação instrumental. Por isso, é importante que, em toda análise, também esteja presente uma amostra controle para que seja definido o TR de referência. Foi estabelecido o limite de aceitação de variação de 0,1 minutos no TR dos analitos nas amostras, tendo como referência a média dos TR dos padrões de referência injetados para a curva de calibração ou ao TR de uma amostra controle. Esse critério consta no guia de validação SANTE (EURL, 2019).

Relatos na literatura indicam que a análise de glicóis é frequentemente susceptível à ocorrência de efeito residual (FU *et al.*, 2011; RESTEK, 2018). Esse problema é tão mais pronunciado à medida que mais injeções são feitas na coluna (FU *et al.*, 2011).

Um dos fatores que pode causar efeito residual na análise de glicóis é a presença de resíduos destes na seringa do injetor, provenientes das amostras analisadas, sendo a seringa responsável pela transferência dos analitos de uma amostra para a outra (RESTEK, 2018). Por isso, foi definido um protocolo extenso de limpeza da seringa. Foram testados diversos solventes e combinações de solventes, bem como número de ciclos de limpeza necessários. Após otimização, ficou definido o emprego de etanol como solvente de limpeza da seringa, sendo efetuados 15 ciclos de limpeza após injeção da amostra e três ciclos imediatamente antes da próxima injeção.

O volume de injeção foi escolhido de modo a evitar o chamado efeito *backflash*. Isso ocorre quando o volume de expansão de vapor da amostra excede a capacidade do *liner* presente no injetor, o que faz com que o vapor saia para o exterior do *liner* e seja transferido para a coluna de maneira ineficiente.

Para as análises de cerveja, na diluição convencional, aproximadamente 20% da composição da amostra injetada é aquosa. Os problemas associados com o emprego da água, como solvente principal, incluem o grande volume de expansão do seu vapor e a geração persistente de danos químicos à fase estacionária. A alta proporção de água pode ultrapassar o volume do *liner* quando sofre expansão, o que pode também aumentar a ocorrência de efeito residual, uma vez que este pode ser originado do efeito *backflash* (FU *et al.*, 2011). Para diminuir o impacto da presença de água na instrumentação analítica, optou-se por trabalhar com um volume de injeção de 0,50 µL, ao invés de 1,0 µL, que é geralmente relatado nos métodos da literatura consultada e que foi empregado nas análises das matrizes GLI, PPG e xaropes. Além disso, uma menor quantidade de amostra injetada também objetivou preservar a coluna, uma vez que as amostras de cerveja contêm outros compostos, que não os glicóis, que também podem introduzir sujidades no equipamento.

Foi ainda escolhida a injeção no modo *split*, que é a mais recomendada para a análise de glicóis, levando à obtenção de picos mais estreitos e com TR mais reprodutíveis (RESTEK, 2018).

A coluna cromatográfica também foi escolhida por ser a mais adequada para essa classe de compostos conforme relatos na literatura (RESTEK, 2018). As

separações em GC são alcançadas pela distribuição de um soluto entre uma fase imobilizada, ou fase estacionária, e uma fase gasosa, que percorre esta fase estacionária. A constante de distribuição é determinada pela temperatura da coluna, que afeta a pressão de vapor do soluto, e pelas interações intermoleculares entre o soluto e a fase estacionária (ABRAHAM *et al.*, 1999).

A fase estacionária da coluna Rtx-Wax é composta por polietilenoglicol, sendo indicada para compostos de polaridade intermediária a alta. Os analitos da classe dos glicóis, que apresentam alta polaridade, interagem com os grupamentos polares presentes na fase estacionária, principalmente por interações dipolo-dipolo e ligações de hidrogênio, em decorrência dos grupamentos hidroxila presentes tanto nos analitos quanto na fase estacionária. Da mesma forma, o metanol também possui grupamentos hidroxila para interagir com os grupamentos de polietilenoglicol. Estas significativas interações dos analitos com a fase estacionária contribuem, assim, para a melhoria da separação dos compostos em GC, juntamente com a temperatura da fase móvel, o que torna esta coluna cromatográfica ideal para o método desenvolvido.

Um aspecto que também deve ser considerado é o sangramento da coluna, um problema potencial na análise de glicóis, já que estes compostos exigem altas temperaturas da coluna para eluição adequada. A coluna Rtx-Wax apresenta baixa tendência à sangramento e apresenta alta vida útil quando desafiada a partir de repetidas injeções de soluções aquosas, permitindo o emprego de temperaturas de até 250 °C. Para análise de glicóis e compostos polares, as colunas Rtx-Wax possibilitam a obtenção de picos finos e reprodutíveis de forma consistente (RESTEK, 2018).

6.2 Otimização do preparo de amostra

6.2.1 Preparo de amostras de cerveja

Para diminuir os problemas mencionados previamente, associados ao alto volume de água injetado no sistema de GC-MS, definiu-se que para o preparo de amostra de cerveja, esta deveria ser diluída em solvente orgânico.

O emprego de acetonitrila foi descartado porque, além de apresentar custo mais elevado, os sinais analíticos foram menos intensos do que no caso de etanol e MeOH. Já para etanol e MeOH, sua adição à cerveja na proporção 8:2 ocasiona a precipitação de alguns componentes da matriz, levando à necessidade de um procedimento de separação desses precipitados e dos componentes da cerveja que são solúveis nesses solventes orgânicos, como os glicóis. Uma vez que os resultados obtidos por injeções de amostras fortificadas e de padrões de referência empregando diluição em MeOH ou etanol foram semelhantes, em termos de intensidade e formato de pico, optou-se pelo etanol como diluente da cerveja, uma vez que este apresenta menor toxicidade e é um solvente ambientalmente mais aceito. Após diluição, definiu-se a centrifugação como procedimento de separação dos componentes da cerveja que são insolúveis em etanol.

Após otimização, o preparo das amostras de cerveja foi definido. A 1,0 mL de cerveja, adicionaram-se 4,0 mL de etanol grau GC-MS em um tubo Falcon de 15 mL. O tubo foi centrifugado por 5 a 10 minutos a 3739 g (4000 rpm) entre 20 e 25 °C. No caso de amostras mais concentradas em EG e DEG, fez-se necessário o emprego de uma segunda diluição em etanol, após a etapa de centrifugação. A seguir, 1,0 mL da solução foi transferida para *vial* e adicionou-se 100 µL de solução de 1,4-BuOH 100 mg L⁻¹. O *vial* foi, então, transferido para o equipamento de GC-MS.

6.2.2 Preparo de amostras de glicerina e propilenoglicol

Definiu-se uma simples diluição para preparo das amostras de GLI e PPG, seguindo-se o que é feito na análise destes glicóis por GC-FID, conforme observado nos estudos já descritos na literatura. Entretanto, algumas diferenças em relação a estes métodos devem ser mencionadas. A primeira delas é que optou-se por empregar etanol como solvente de diluição no lugar de MeOH, uma vez que este foi incluído como um analito no método. Além disso, as amostras de GLI ou PPG foram injetadas em maior diluição (dez vezes menos concentrada do que aquelas empregadas nos trabalhos já descritos), o que pode permitir uma maior durabilidade da coluna cromatográfica, do *liner* e menor necessidade de

intervenções e/ou limpeza do equipamento. Pela maior detectabilidade da técnica de GC-MS, foi possível obter LD na mesma faixa de grandeza dos trabalhos descritos para GC-FID, empregando-se menor quantidade de amostra.

Definiu-se, então, a diluição de GLI ou PPG com etanol grau GC-MS à concentração de 5.000 mg L⁻¹. A um *vial* contendo 100 µL de solução de 1,4-BuOH 100 mg L⁻¹, adicionou-se 1,0 mL da solução de GLI ou PPG. O *vial* foi, então, transferido para o equipamento de GC-MS.

6.2.3 Preparo de amostras de xarope

Definiu-se uma simples diluição para o preparo das amostras de xarope, seguindo-se o que é feito na análise destes glicóis por GC-FID, conforme observado da literatura. Assim como descrito para GLI e PPG e, pelos mesmos motivos, empregou-se etanol como solvente de diluição em substituição ao MeOH. Foram testadas diluições da amostra empregando fator de diluição 100 e 250, sendo os resultados de exatidão e precisão satisfatórios para ambas as condições. Optou-se pelo fator de diluição de 100 vezes com objetivo de alcançar menores valores de LD e LQ.

O preparo foi padronizado da seguinte forma: a um balão volumétrico de 10 mL, adicionou-se 1,0 mL de amostra da preparação farmacêutica, 2,0 mL de água e o volume foi completado com etanol grau GC-MS. Após homogeneização, 100 µL da solução foram transferidos para um *vial* ao qual foram adicionados 900 µL de etanol e 100 µL de solução de 1,4-BuOH 100 mg L⁻¹. O *vial* foi, então, transferido para o equipamento de GC-MS.

6.3 Validação

A Tabela 11, a seguir, apresenta um resumo dos resultados da validação dos métodos.

Tabela 11 – Resumo dos resultados de validação dos métodos analíticos desenvolvidos.

Figuras de Mérito	Resultados			
	Método para determinação de EG e DEG em cerveja	Método para determinação de EG, DEG e MeOH em glicerina	Método para determinação de EG, DEG e MeOH em propilenoglicol	Método para determinação de EG, DEG e MeOH em xarope
<p>Seletividade</p> <p>Critério:</p> <p>Ausência de picos interferentes de mesma m/z no mesmo tempo de retenção dos analitos</p>	<p>Seletividade satisfatória avaliada mediante a ausência de picos cromatográficos interferentes, de mesma m/z e no mesmo tempo de retenção dos analitos.</p> <p>Efeito matriz considerado estatisticamente significativo.</p>	<p>Seletividade satisfatória avaliada mediante a ausência de picos cromatográficos interferentes, de mesma m/z e no mesmo tempo de retenção dos analitos.</p> <p>Efeito matriz não considerado estatisticamente significativo.</p>	<p>Seletividade satisfatória avaliada mediante a ausência de picos cromatográficos interferentes, de mesma m/z e no mesmo tempo de retenção dos analitos.</p> <p>Efeito matriz considerado estatisticamente significativo.</p>	<p>Seletividade satisfatória avaliada mediante a ausência de picos cromatográficos interferentes, de mesma m/z e no mesmo tempo de retenção dos analitos.</p> <p>Efeito matriz não considerado estatisticamente significativo.</p>
<p>Linearidade</p> <p>Critérios:</p> <p>t calculado > t crítico;</p> <p>coeficiente de correlação $r_w > 0,990$</p>	<p>Faixa linear validada: 3 a 50 mg L⁻¹ de EG ou DEG.</p> <p>As curvas de calibração apresentaram regressão estatisticamente significativa, avaliada mediante:</p> <ul style="list-style-type: none"> - teste t: t calculado > t crítico ($\alpha = 0,05$); - menor valor de $r_w = 0,990$. 	<p>Faixa linear validada: 1 a 20 mg L⁻¹ de EG, DEG ou MeOH.</p> <p>As curvas de calibração apresentaram regressão estatisticamente significativa, avaliada mediante:</p> <ul style="list-style-type: none"> - teste t: t calculado > t crítico ($\alpha = 0,05$); - menor valor de $r_w = 0,999$. 	<p>Faixa linear validada: 1 a 20 mg L⁻¹ de EG, DEG ou MeOH.</p> <p>As curvas de calibração apresentaram regressão estatisticamente significativa, avaliada mediante:</p> <ul style="list-style-type: none"> - teste t: t calculado > t crítico ($\alpha = 0,05$); - menor valor de $r_w = 0,996$. 	<p>Faixa linear validada: 1 a 20 mg L⁻¹ de EG, DEG ou MeOH.</p> <p>As curvas de calibração apresentaram regressão estatisticamente significativa, avaliada mediante:</p> <ul style="list-style-type: none"> - teste t: t calculado > t crítico ($\alpha = 0,05$); - menor valor de $r_w = 0,999$.

Tabela 11 – Resumo dos resultados de validação dos métodos analíticos desenvolvidos (continuação).

Figuras de Mérito	Resultados			
	Método para determinação de EG e DEG em cerveja	Método para determinação de EG, DEG e MeOH em glicerina	Método para determinação de EG, DEG e MeOH em propilenoglicol	Método para determinação de EG, DEG e MeOH em xarope
<p>Exatidão</p> <p>Critério:</p> <p>Diferença entre a concentração real e a teórica de no máximo 20%</p>	<p>Maior diferença entre a concentração real e teórica nos quatro níveis de concentração avaliados:</p> <p>- EG: 14,1%</p> <p>- DEG: 8,9%</p>	<p>Maior diferença entre a concentração real e teórica nos três níveis de concentração avaliados:</p> <p>- EG: 2,0%</p> <p>- DEG: 10,6%</p> <p>- MeOH: 6,4%</p>	<p>Maior diferença entre a concentração real e teórica nos três níveis de concentração avaliados:</p> <p>- EG: 1,7%</p> <p>- DEG: 13,6%</p> <p>- MeOH: 8,3%</p>	<p>Maior diferença entre a concentração real e teórica nos três níveis de concentração avaliados:</p> <p>- EG: 7,1%</p> <p>- DEG: 17,2%</p> <p>- MeOH: 10,2%</p>
<p>Precisão (Repetibilidade)</p> <p>Critério:</p> <p>DPR máximo de Horwitz:</p> <p>16,0% (1 mg L⁻¹);</p> <p>13,6% (3 mg L⁻¹);</p> <p>12,6% (5 mg L⁻¹);</p> <p>11,3% (10 mg L⁻¹);</p> <p>10,2% (20 mg L⁻¹);</p> <p>8,9% (50 mg L⁻¹).</p>	<p>- Maior DPR para EG:</p> <p>7,4% (3 mg L⁻¹);</p> <p>8,6% (5 mg L⁻¹);</p> <p>3,9% (20 mg L⁻¹);</p> <p>2,6% (50 mg L⁻¹).</p> <p>- Maior DPR para DEG:</p> <p>7,4% (3 mg L⁻¹);</p> <p>8,6% (5 mg L⁻¹);</p> <p>3,9% (20 mg L⁻¹);</p> <p>2,6% (50 mg L⁻¹).</p>	<p>- Maior DPR para EG:</p> <p>5,5% (1 mg L⁻¹);</p> <p>7,4% (10 mg L⁻¹);</p> <p>4,8% (20 mg L⁻¹).</p> <p>- Maior DPR para DEG:</p> <p>4,9% (1 mg L⁻¹);</p> <p>7,1% (10 mg L⁻¹);</p> <p>5,1% (20 mg L⁻¹).</p> <p>- Maior DPR para MeOH:</p> <p>10,4% (1 mg L⁻¹);</p> <p>7,7% (10 mg L⁻¹);</p> <p>5,0% (20 mg L⁻¹).</p>	<p>- Maior DPR para EG:</p> <p>7,5% (1 mg L⁻¹);</p> <p>5,6% (10 mg L⁻¹);</p> <p>4,5% (20 mg L⁻¹).</p> <p>- Maior DPR para DEG:</p> <p>15,5% (1 mg L⁻¹);</p> <p>4,3% (10 mg L⁻¹);</p> <p>5,1% (20 mg L⁻¹).</p> <p>- Maior DPR para MeOH:</p> <p>7,8% (1 mg L⁻¹);</p> <p>2,8% (10 mg L⁻¹);</p> <p>6,9% (20 mg L⁻¹).</p>	<p>- Maior DPR para EG:</p> <p>8,2% (1 mg L⁻¹);</p> <p>4,4% (10 mg L⁻¹);</p> <p>9,7% (20 mg L⁻¹).</p> <p>- Maior DPR para DEG:</p> <p>9,8% (1 mg L⁻¹);</p> <p>3,8% (10 mg L⁻¹);</p> <p>7,7% (20 mg L⁻¹).</p> <p>- Maior DPR para MeOH:</p> <p>13,6% (1 mg L⁻¹);</p> <p>4,3% (10 mg L⁻¹);</p> <p>9,5% (20 mg L⁻¹).</p>

Tabela 11 – Resumo dos resultados de validação dos métodos analíticos desenvolvidos (continuação).

Figuras de Mérito	Resultados			
	Método para determinação de EG e DEG em cerveja	Método para determinação de EG, DEG e MeOH em glicerina	Método para determinação de EG, DEG e MeOH em propilenoglicol	Método para determinação de EG, DEG e MeOH em xarope
<p>Precisão (Precisão Intermediária)</p> <p>Critério: DPR máximo de Horwitz:</p> <p>16,0% (1 mg L⁻¹); 13,6% (3 mg L⁻¹); 12,6% (5 mg L⁻¹); 11,3% (10 mg L⁻¹); 10,2% (20 mg L⁻¹); 8,9% (50 mg L⁻¹).</p>	<p>- DPR para EG: 8,0% (3 mg L⁻¹); 10,1% (5 mg L⁻¹); 5,1% (20 mg L⁻¹); 3,6% (50 mg L⁻¹).</p> <p>- DPR para DEG: 8,4% (3 mg L⁻¹); 7,5% (5 mg L⁻¹); 4,6% (20 mg L⁻¹); 4,3% (50 mg L⁻¹).</p>	<p>- DPR para EG: 8,8% (1 mg L⁻¹); 5,8% (10 mg L⁻¹); 3,6% (20 mg L⁻¹).</p> <p>- DPR para DEG: 11,3% (1 mg L⁻¹); 10,4% (10 mg L⁻¹); 5,7% (20 mg L⁻¹).</p> <p>- DPR para MeOH: 12,3% (1 mg L⁻¹); 8,5% (10 mg L⁻¹); 8,8% (20 mg L⁻¹).</p>	<p>- DPR para EG: 6,8% (1 mg L⁻¹); 4,2% (10 mg L⁻¹); 3,6% (20 mg L⁻¹).</p> <p>- DPR para DEG: 13,4% (1 mg L⁻¹); 3,2% (10 mg L⁻¹); 4,7% (20 mg L⁻¹).</p> <p>- DPR para MeOH: 10,4% (1 mg L⁻¹); 3,3% (10 mg L⁻¹); 4,9% (20 mg L⁻¹).</p>	<p>- DPR para EG: 7,7% (1 mg L⁻¹); 5,4% (10 mg L⁻¹); 7,7% (20 mg L⁻¹).</p> <p>- DPR para DEG: 7,8% (1 mg L⁻¹); 5,7% (10 mg L⁻¹); 5,8% (20 mg L⁻¹).</p> <p>- DPR para MeOH: 10,6% (1 mg L⁻¹); 10,1% (10 mg L⁻¹); 8,3% (20 mg L⁻¹).</p>
Limite de Detecção	EG: 5 mg L ⁻¹ ; DEG: 10 mg L ⁻¹ .	EG: 50 mg Kg ⁻¹ ; DEG: 50 mg Kg ⁻¹ ; MeOH: 50 mg Kg ⁻¹ .	EG: 100 mg Kg ⁻¹ ; DEG: 50 mg Kg ⁻¹ ; MeOH: 50 mg Kg ⁻¹ .	EG: 75 mg L ⁻¹ ; DEG: 75 mg L ⁻¹ ; MeOH: 75 mg L ⁻¹ .
Limite de Quantificação	EG: 15 mg L ⁻¹ ; DEG: 15 mg L ⁻¹ .	EG: 200 mg Kg ⁻¹ ; DEG: 200 mg Kg ⁻¹ ; MeOH: 200 mg Kg ⁻¹ .	EG: 200 mg Kg ⁻¹ ; DEG: 200 mg Kg ⁻¹ ; MeOH: 200 mg Kg ⁻¹ .	EG: 100 mg L ⁻¹ ; DEG: 100 mg L ⁻¹ ; MeOH: 100 mg L ⁻¹ .

6.3.1 Seletividade

6.3.1.1 Seletividade para o método de determinação de EG e DEG em cerveja

As Figuras 19 e 20 apresentam, respectivamente, os íons monitorados de EG (m/z 31,43 e 61) e DEG (m/z 45 e 75). Na figura 21 pode-se perceber a ausência desses picos no solvente etanol.

Figura 19 - Cromatograma (abundância de íons *versus* tempo) obtido no modo SIM para solução de EG 100 mg L⁻¹ (TIC e EIC).

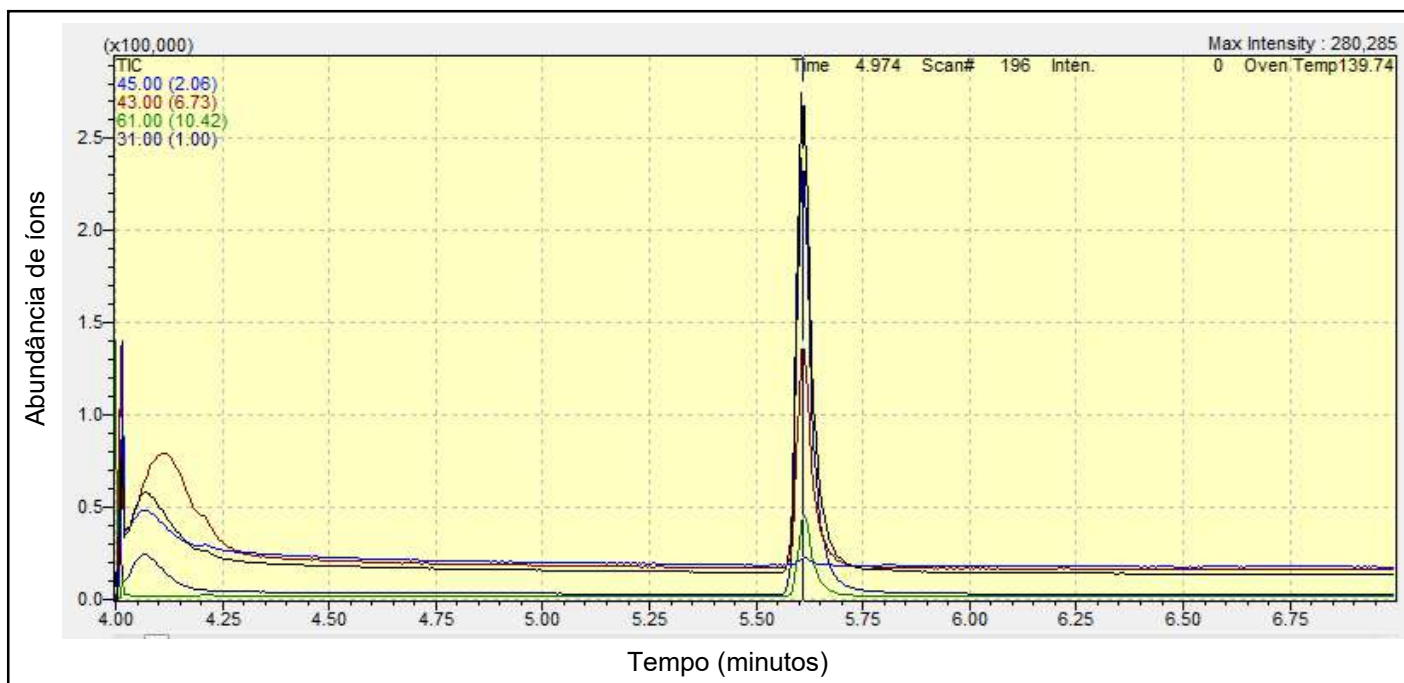


Figura 20 – Cromatograma (abundância de íons versus tempo) obtido no modo SIM para solução de DEG 100 mg L⁻¹ (TIC e EIC).

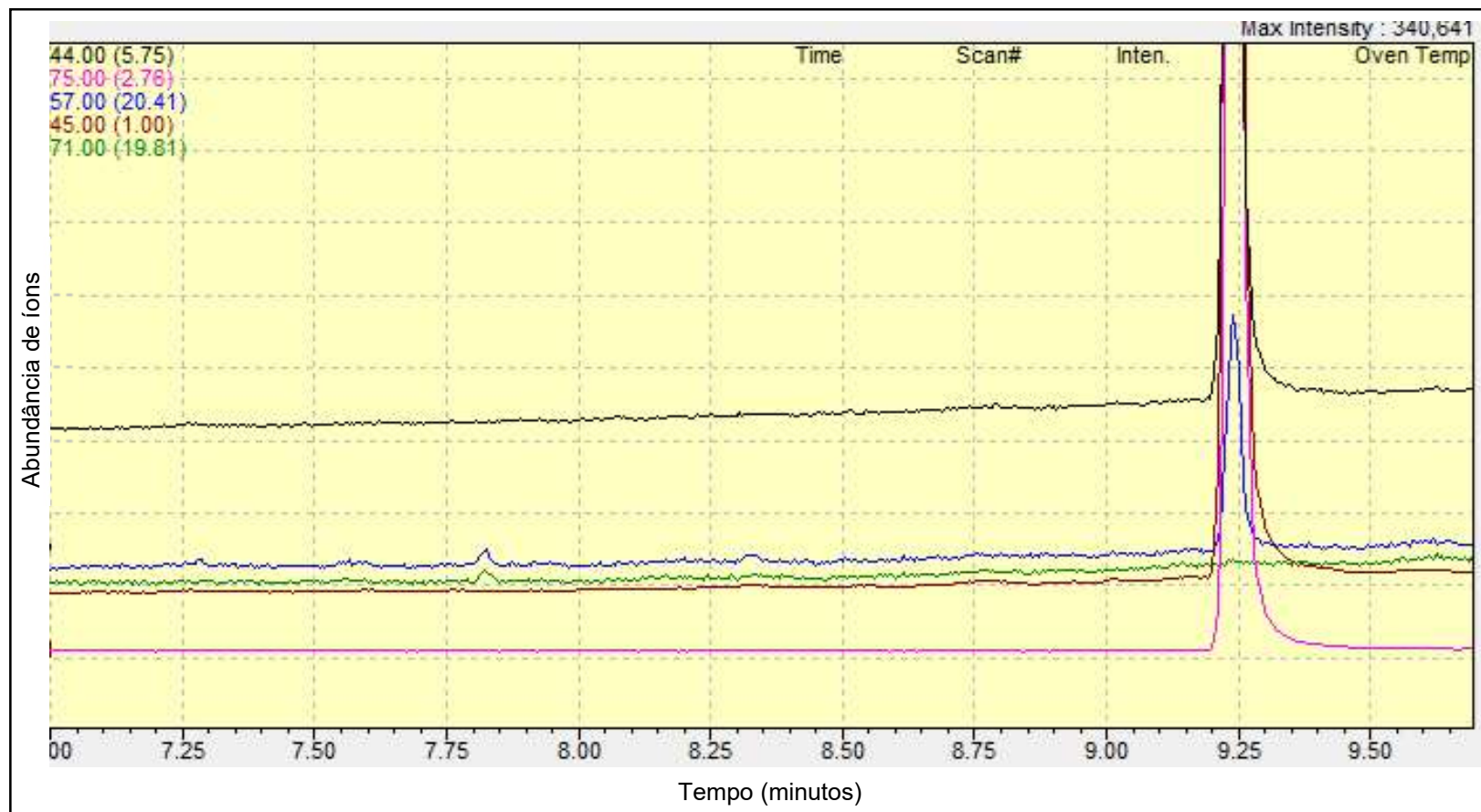
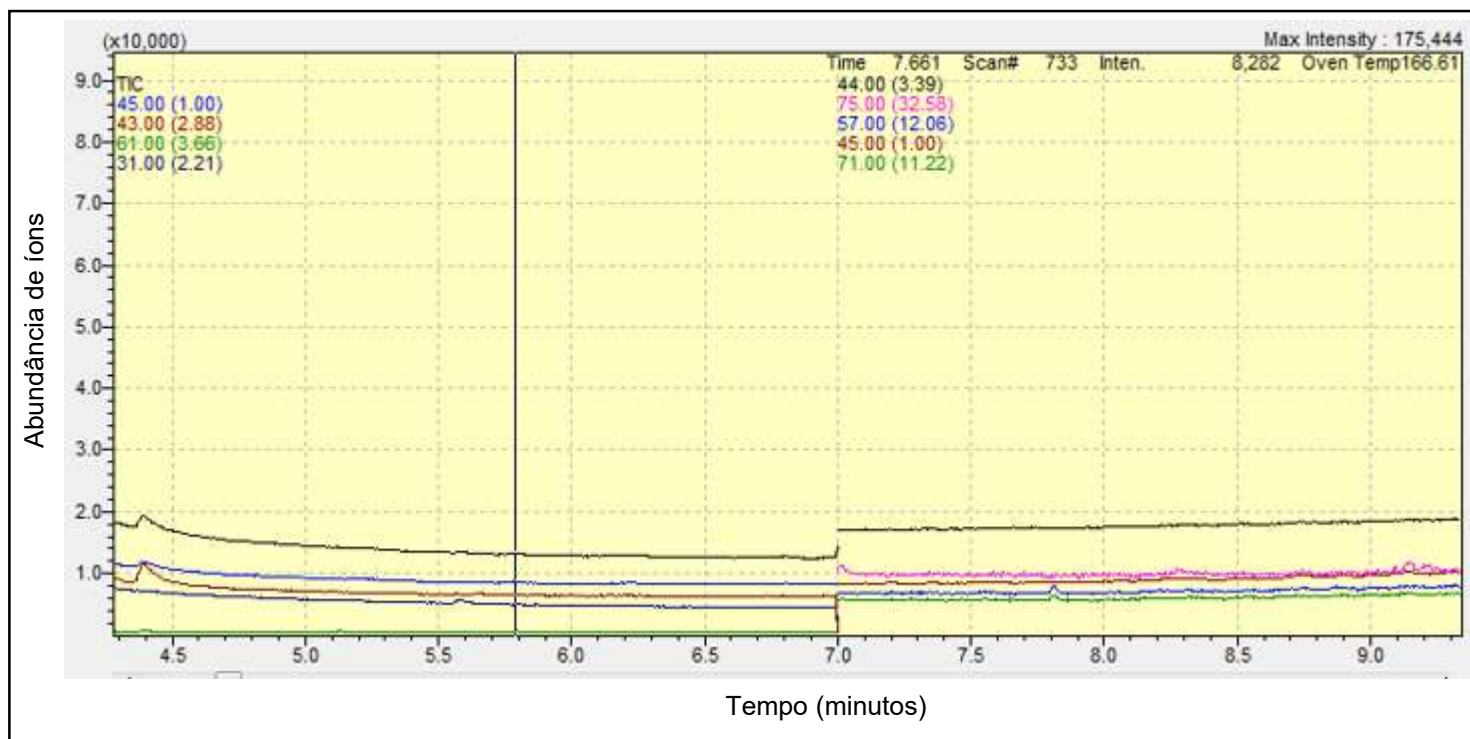


Figura 21 – Cromatograma (abundância de íons *versus* tempo) obtido no modo SIM para o solvente etanol (TIC e EIC).



As Figuras 22 e 23 apresentam, respectivamente, os íons monitorados de EG (m/z 31,43 e 61) e DEG (m/z 45 e 75), bem como evidencia que cada um destes compostos não apresenta picos interferentes nos mesmos TR dos demais.

A Figura 24 apresenta os picos característicos do PI e demonstra a ausência de picos de mesmo m/z e no mesmo TR de EG e DEG.

A Figura 25 apresenta o cromatograma de uma amostra de cerveja adotada como branca para o método.

Figura 22 – Destaque para m/z específicos de EG dos cromatogramas (abundância de íons *versus* tempo) obtidos no modo SIM para solução de EG 100 mg L⁻¹ - m/z 43, 61 e 31, nesta ordem, seguido da demonstração da ausência de picos interferentes no TR de DEG - m/z 75 e 45, nesta ordem.

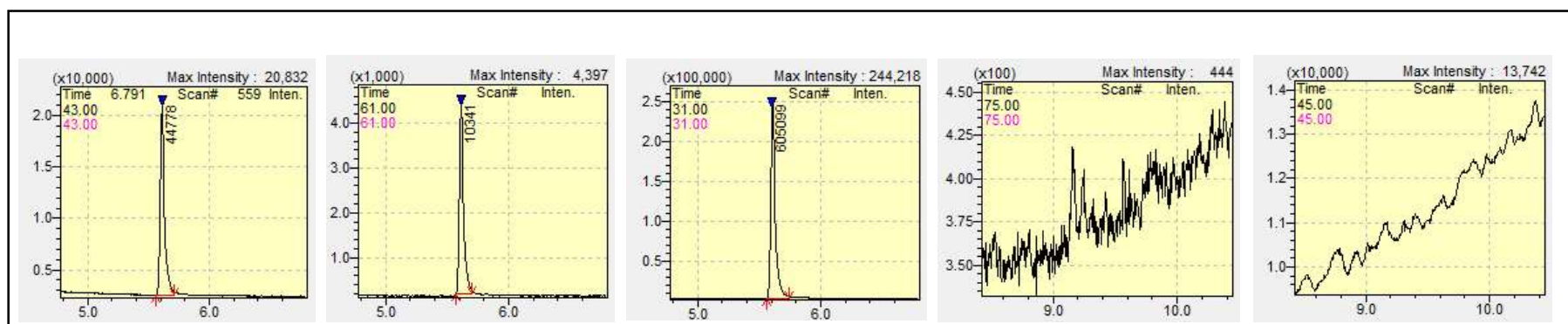


Figura 23 – Destaque para m/z específicos de DEG dos cromatogramas (abundância de íons *versus* tempo) obtidos no modo SIM para solução de DEG 100 mg L⁻¹ - m/z 75 e 45, nesta ordem, seguido da demonstração da ausência de picos interferentes no TR de EG - m/z 43, 61 e 31, nesta ordem.

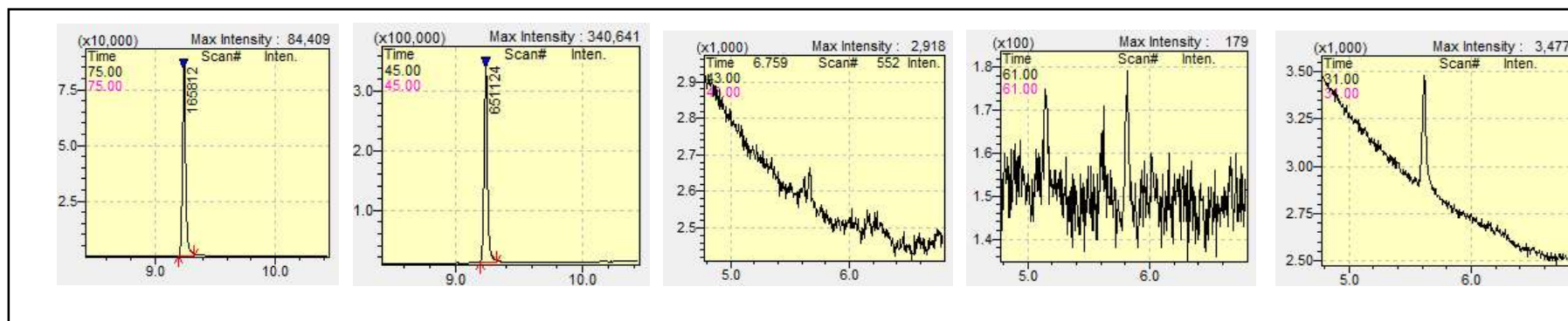


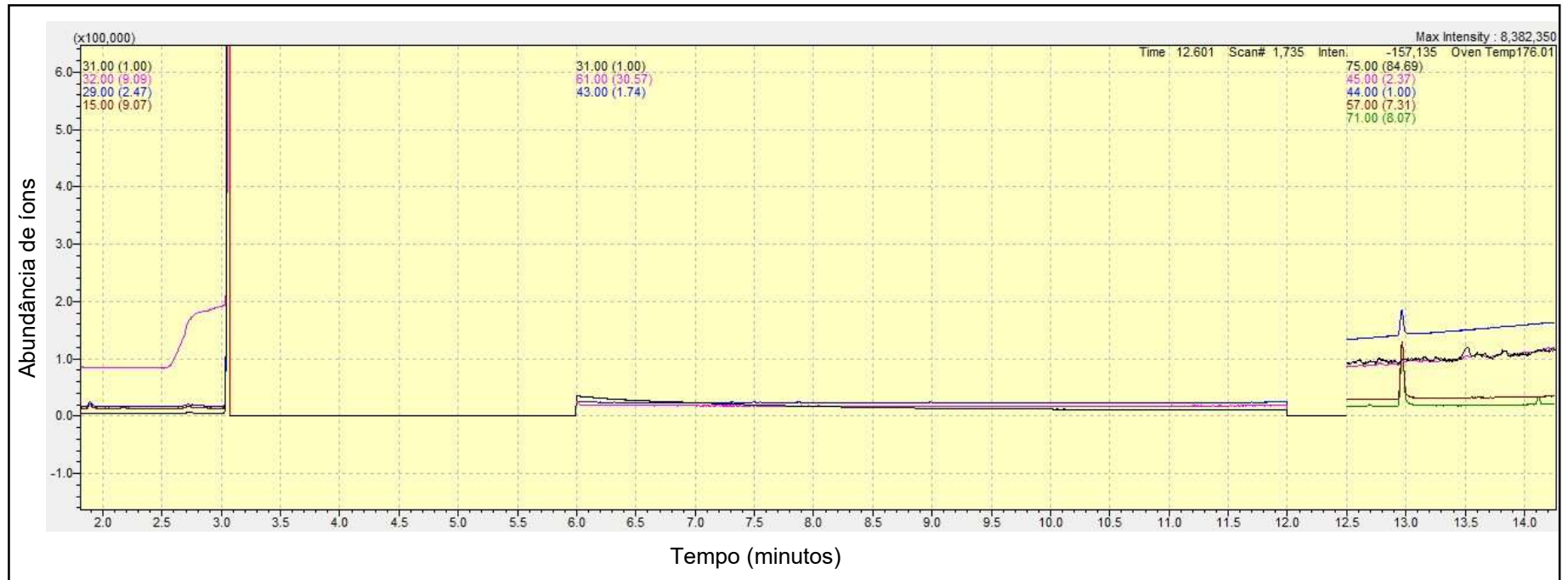
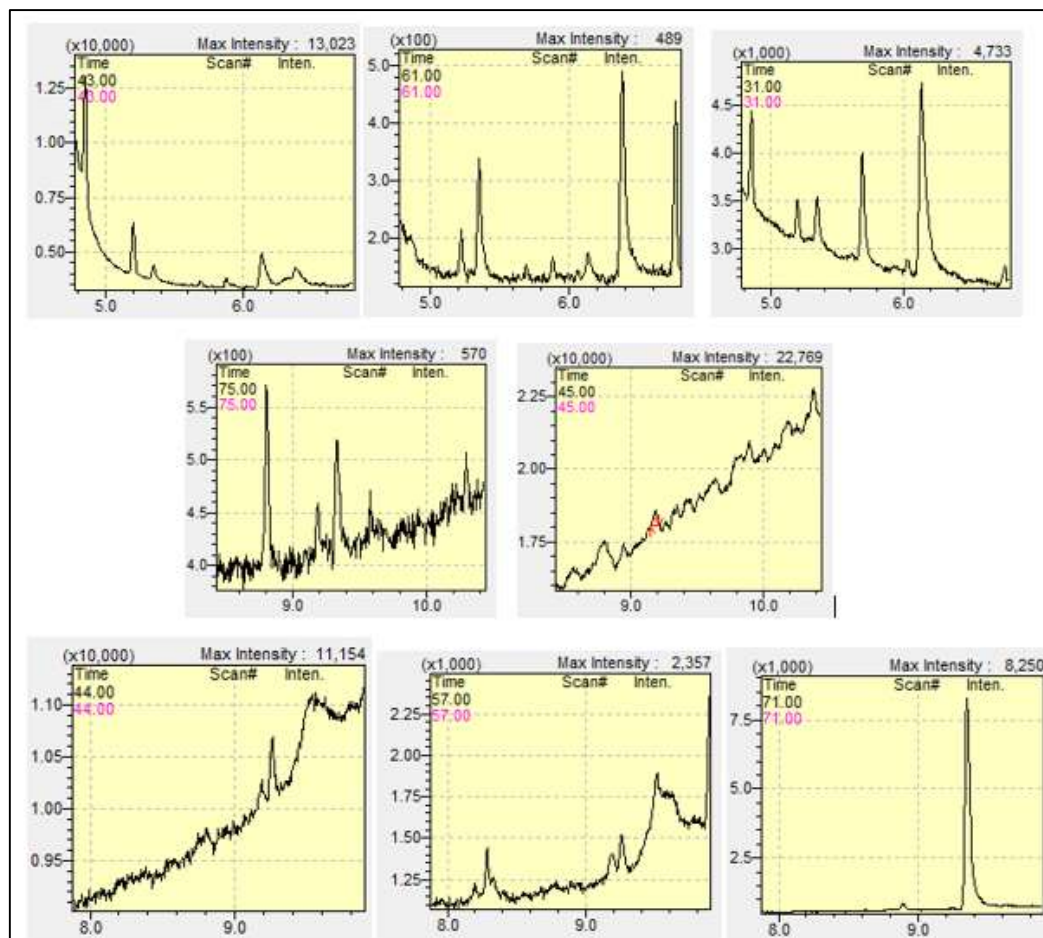
Figura 24 – Cromatograma (abundância de íons versus tempo) obtido no modo SIM para a ST de 1,4-BuOH 10 mg L⁻¹.

Figura 25 – Cromatogramas (abundância de íons *versus* tempo) de amostra branca (20BEB0263) e a busca por íons característicos dos analitos. 1ª linha: EG *m/z* 43, 61 e 31 (TR 5,6). 2ª linha: DEG *m/z* 75 e 45 (TR 9,2). 3ª linha: 1,4-BuOH *m/z* 44, 57 e 71 (TR 8,7).



As amostras brancas de cerveja apresentam íon m/z 31 no TR do EG e sempre em intensidade considerável, sendo um íon inespecífico para essa matriz porque várias substâncias presentes na cerveja podem gerar este íon. Assim, apesar de ser o íon mais intenso observado para os padrões de referência de EG, este não é adequado para fins de quantificação, mas deve ser monitorado porque toda amostra que apresenta EG deverá apresentá-lo, por ser um íon qualificador, assim como o íon de m/z 43. O íon de m/z 61 foi selecionado como íon quantificador.

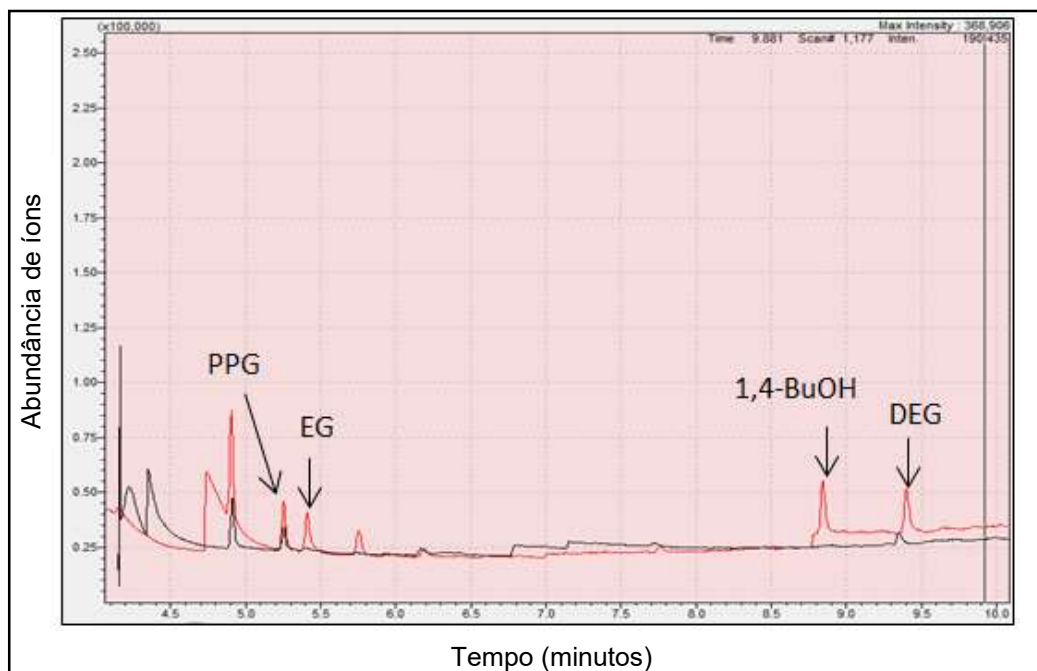
Já em relação ao DEG, as amostras brancas não apresentam interferentes. O íon de m/z 75 foi o definido como íon quantificador porque, embora o íon qualificador m/z 45 seja mais intenso, ele é também mais susceptível às flutuações da linha de base, o que gera picos com piores formatos, difíceis de serem integrados em menores concentrações do analito. Possui, assim, relação sinal/ruído (S/R) mais baixa em menores concentrações do analito, apresentando menor detectabilidade.

Nenhuma das amostras brancas de cerveja apresenta picos interferentes no TR do PI empregado no método analítico.

A Figura 26, a seguir, ilustra um cromatograma em modo *full scan* de amostra branca e amostra branca fortificada com EG, DEG, PPG, em concentração equivalente a 15 mg L^{-1} e com o PI na concentração usual do método. Observa-se que o PPG não afeta a seletividade do método, por eluir em TR distinto dos analitos e do PI.

Além do monitoramento de íons qualificadores, além dos íons quantificadores, o limite de aceitação de variação de 0,1 minutos no TR dos analitos nas amostras, tendo como referência a média dos TR dos padrões de referência injetados para a curva de calibração ou ao TR de uma amostra controle, é mais um fator que aumenta a seletividade da técnica.

Figura 26 – Cromatograma (abundância de íons *versus* tempo) de íons totais de amostra branca (em preto) e amostra branca fortificada com EG, DEG e PPG 15 mg L⁻¹ e com o padrão interno na concentração usual do método (em vermelho).



Outra estratégia que objetiva aumentar a seletividade da técnica é o cálculo da razão de íons, definida pela razão da área do pico com razão m/z menos intenso pela área do pico com razão m/z mais intenso de um analito em questão. O íon quantificador poderá estar no numerador ou no denominador, dependendo se ele é mais ou menos intenso que o íon qualificador. Essa razão, calculada nas amostras que contém os analitos, é comparada à razão de referência, obtida pelo cálculo dessa razão a partir das injeções de padrões de referência.

A Tabela 12 apresenta os critérios de aceitação para variação da razão de íons na amostra em relação à referência. Conforme pode-se observar, o critério é dependente da intensidade relativa entre os íons: quanto menor é este valor, maior é a variação permitida.

Na análise de amostras de cerveja com contaminação real foi feita a confirmação de EG pela razão entre os íons m/z 61 e m/z 43, e a confirmação de DEG pela razão entre os íons m/z 75 e m/z 45.

Tabela 12 – Critério de aceitabilidade para variação da razão de íons em GC, modo de ionização por impacto eletrônico.

Intensidade relativa (% em relação ao pico base)	Limite de variação permitido
> 50%	± 10%
20 a 50%	± 15%
10 a 20%	± 20%
≤ 10%	± 50%

Fonte: EC, 2021

6.3.1.2 Seletividade para o método de determinação de EG, DEG e MeOH em glicerina, propilenoglicol e xaropes

A análise por GC-MS do solvente empregado, etanol, demonstrou que o mesmo possui picos referentes aos íons com m/z 29, 31 e 32 no mesmo TR do MeOH. Por causa disso, optou-se por empregar o íon m/z 15 para o MeOH, que apesar de ter menos detectabilidade, foi mais seletivo. O solvente etanol não apresentou picos interferentes no mesmo TR dos demais analitos – EG e DEG. Os resultados constam na Figura 27.

Soluções padrão de EG (Figura 28), DEG (Figura 29), MeOH (Figura 30) e PI (Figura 31) foram injetadas no sistema de GC-MS e foi possível evidenciar que nenhum dos analitos apresentou interferência em relação aos demais, comprovando sua pureza.

Nas condições empregadas neste método, a injeção de GLI (Figura 32) e PPG (Figura 33) não levaram à introdução de interferentes no mesmo TR de EG, DEG, MeOH ou do PI, demonstrando a seletividade da técnica.

Foi feita injeção de xarope empregado como amostra branca nos experimentos de validação (Figura 34), evidenciando que a matriz não apresenta interferentes no mesmo tempo de retenção para os mesmos valores de m/z dos analitos, evidenciando a seletividade da técnica.

As amostras brancas de GLI, PPG e xaropes fortificados com os analitos constam nas Figuras 16, 17 e 18, na qual é possível a visualização de picos bem resolvidos, referentes aos íons monitorados de MeOH, EG, DEG e 1,4-BuOH.

Figura 27 – Pesquisa de íons interferentes no solvente etanol - m/z específicos e no TR de MeOH, EG, PI e DEG, nesta ordem.

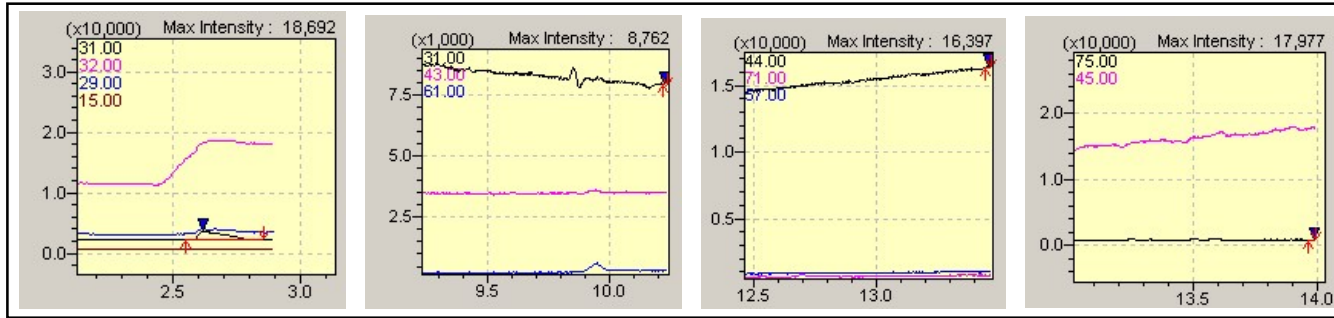


Figura 28 – Comprovação de pureza da solução de EG 20 mg L⁻¹ pela pesquisa dos valores de m/z específicos e no TR de MeOH, EG, PI e DEG.

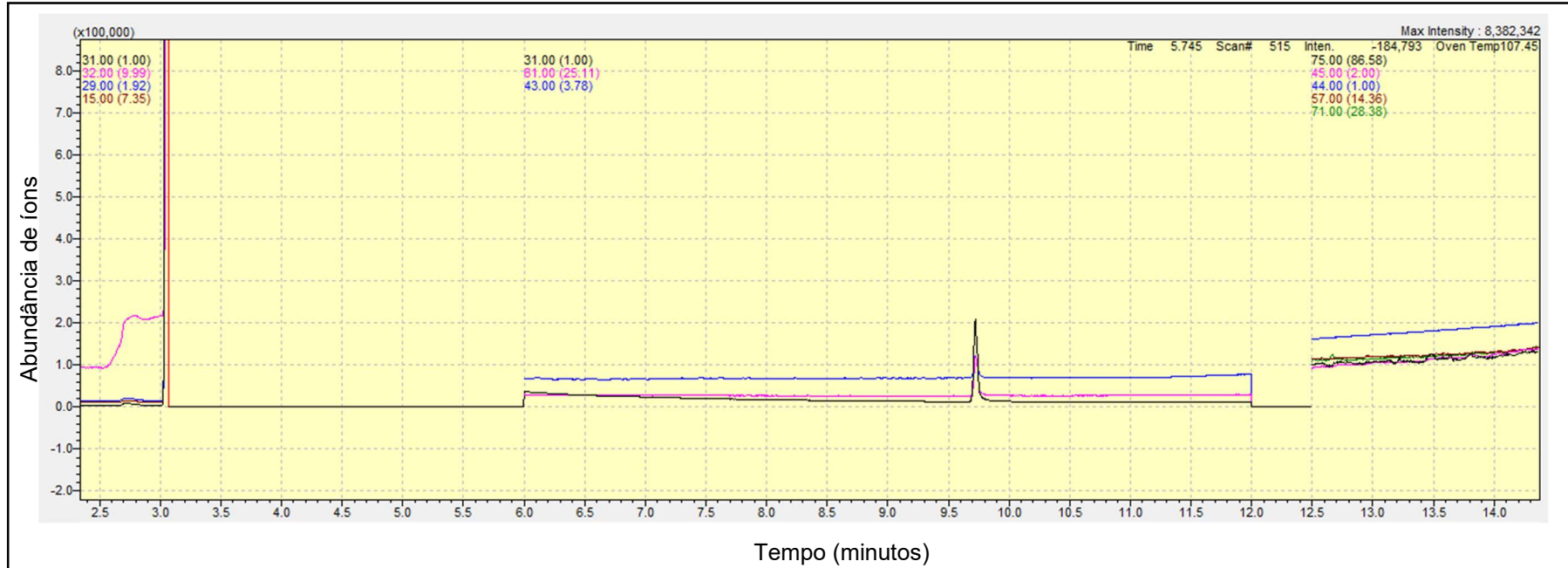


Figura 29 – Comprovação de pureza da solução de DEG 20 mg L⁻¹ pela pesquisa dos valores de *m/z* específicos e no TR de MeOH, EG, PI e DEG.

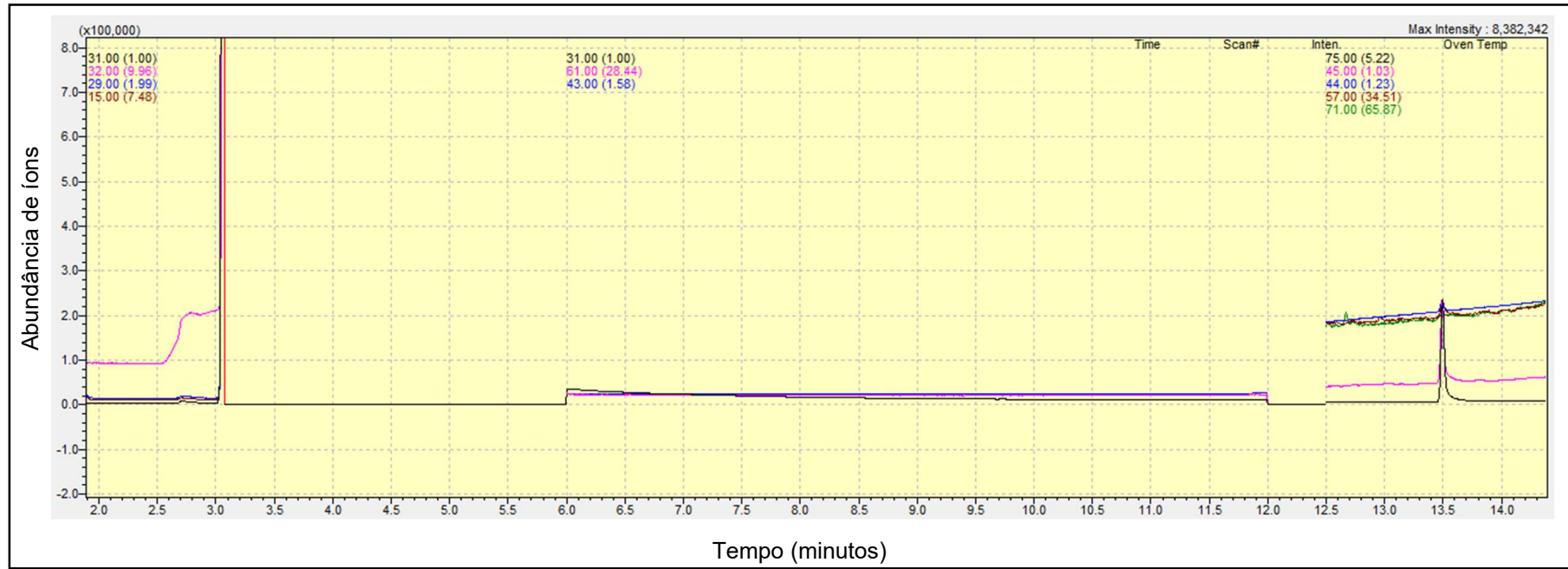


Figura 30 – Comprovação de pureza da solução de MeOH 20 mg L⁻¹ pela pesquisa dos valores de *m/z* específicos e no TR de MeOH, EG, PI e DEG.

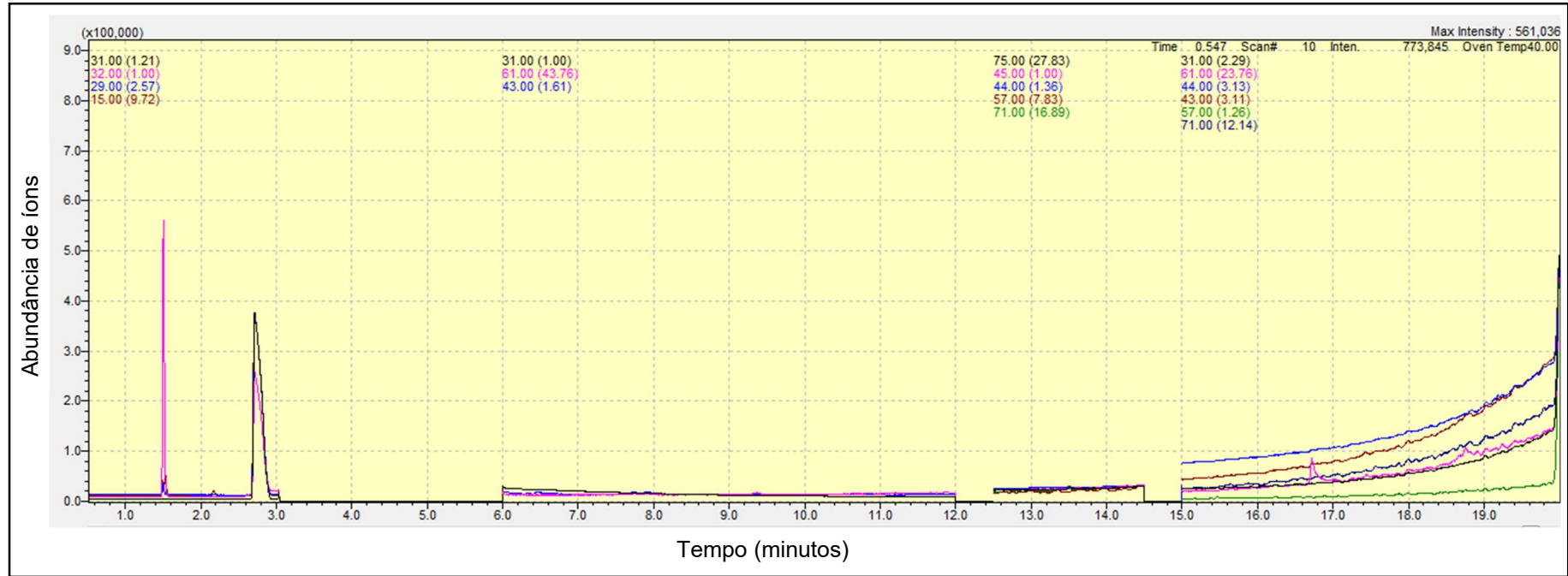


Figura 31 – Comprovação de pureza da solução do PI 10 mg L⁻¹ pela pesquisa dos valores de *m/z* específicos e no TR de MeOH, EG, PI e DEG.

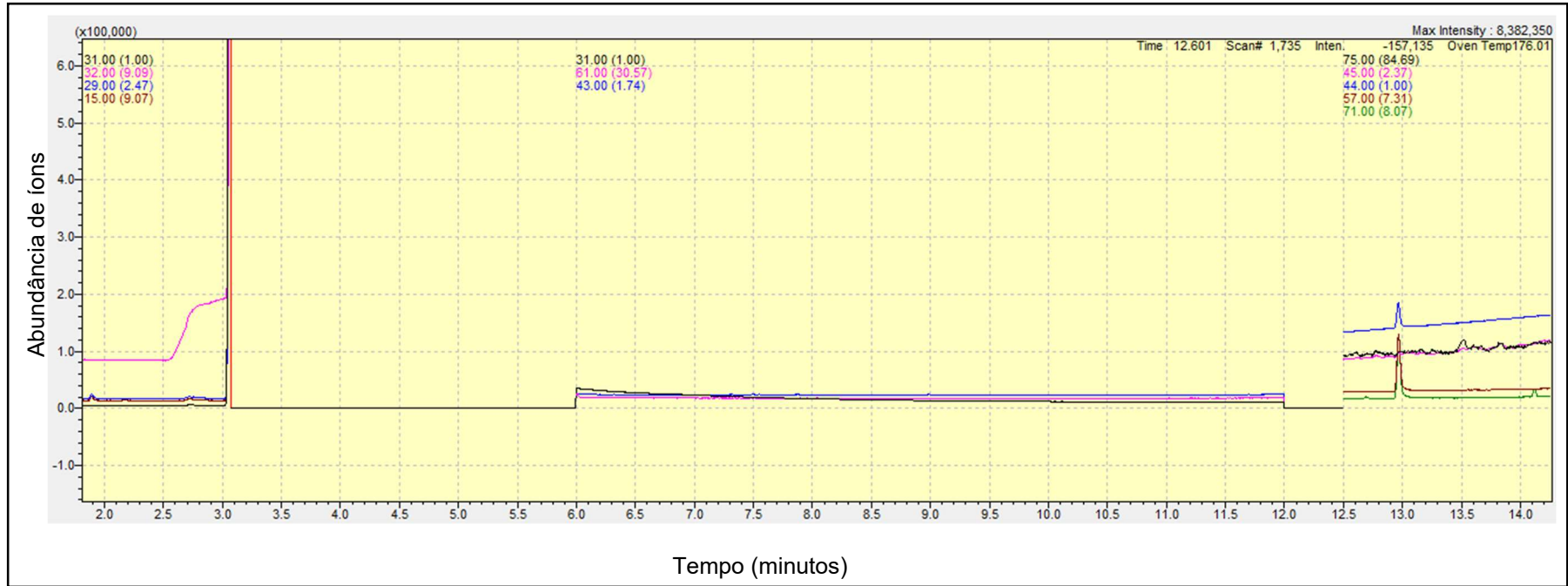


Figura 32 – Pesquisa de picos interferentes em solução de GLI 5.000 mg L⁻¹ - *m/z* específicos e no TR de MeOH, EG, PI e DEG, nesta ordem.

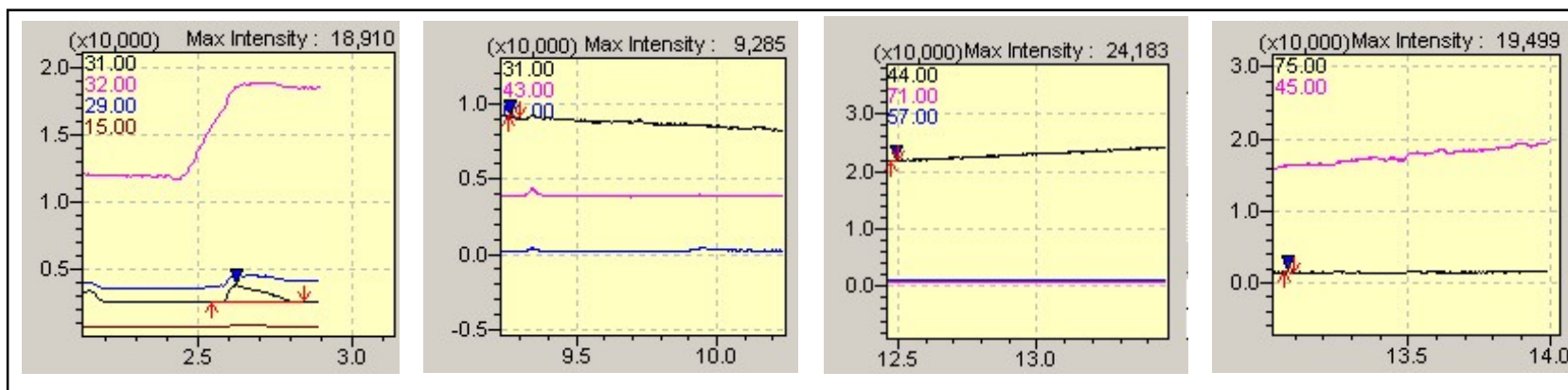


Figura 33 – Pesquisa de picos interferentes em solução de PPG 5.000 mg L⁻¹ - *m/z* específicos e no TR de MeOH, EG, PI e DEG, nesta ordem.

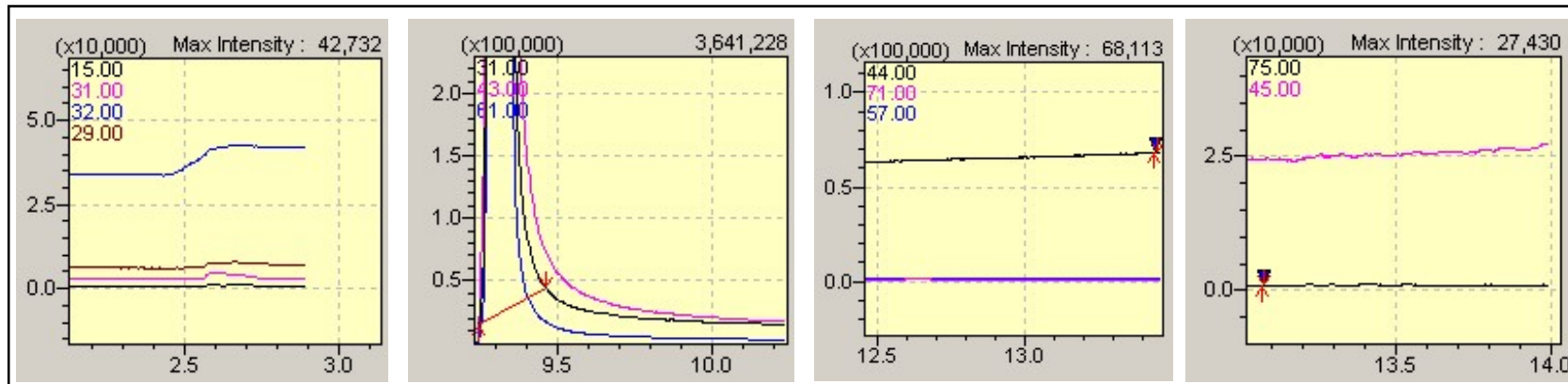
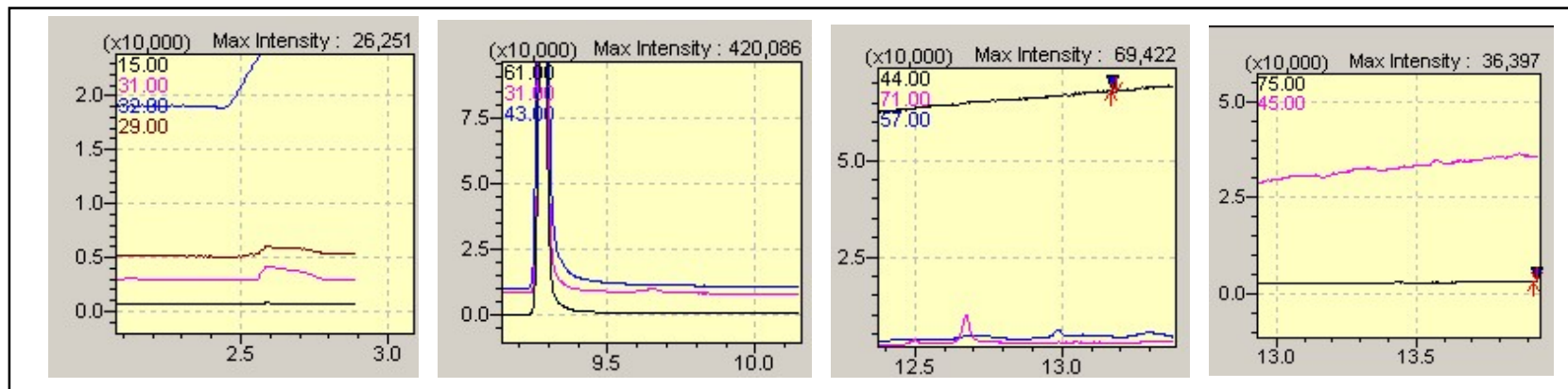


Figura 34 – Pesquisa de picos interferentes em solução de xarope branco - m/z específicos e no TR de MeOH, EG, PI e DEG, nesta ordem.



Em algumas amostras de xarope branco, observou-se a presença de flutuações da linha de base para o íon m/z 31 no mesmo TR de EG, de tal forma que selecionou-se o fragmento m/z 61 como íon quantificador do método, por ser mais seletivo. Por outro lado, para amostras de PPG e GLI, selecionou-se o fragmento m/z 31 como íon quantificador, por ser mais intenso e não ter apresentado problemas de seletividade nessas matrizes.

As elevações observadas para os valores de m/z 29, 31 e 32 no TR de MeOH observadas nos cromatogramas de GLI, PPG e xaropes são devidas ao diluente da análise, o etanol. Como o diluente não apresenta o íon m/z 15 no mesmo TR de MeOH, este foi considerado seletivo e empregado como o íon quantificador do método nessas três matrizes.

No caso do DEG, assim como para as cervejas, empregou-se o fragmento m/z 75 como íon quantificador para os métodos em GLI, PPG e xaropes.

6.3.1.3 Efeito matriz

6.3.1.3.1 Efeito matriz nas análises de cerveja

Ao iniciar o desenvolvimento do método analítico, suspeitava-se que haveria efeito matriz significativo, pelo fato da cerveja ser uma amostra complexa, que aumenta a possibilidade da presença de compostos capazes de induzir ou suprimir o sinal analítico dos íons característicos. Então, optou-se por testar o efeito matriz pelo método de comparação dos interceptos e das inclinações de três CCAS independentes e de três CCEMB independentes, já que, caso o efeito matriz fosse significativo, seria possível utilizar os dados das CCEMBF para os testes de linearidade.

Para este método de avaliação, inicialmente, os dados de inclinação e intercepto foram testados em relação à normalidade, empregando o teste Shapiro-Wilk. Os valores de p foram superiores a 0,05 para todos os grupos analisados, sendo os dados considerados normais.

Os resultados para a avaliação de efeito matriz por comparação dos parâmetros das curvas de calibração constam na Tabela 13.

Tabela 13 – Resultados obtidos na comparação estatística dos interceptos e inclinações de CCAS e CCEMBF.

Parâmetros das curvas de calibração	Analito	Análise das variâncias			Análise dos Parâmetros		
		Graus de liberdade	F _{calculado}	F _{crítico}	Graus de liberdade	t _{calculado}	t _{crítico}
Inclinação	EG m/z 61	17; 17	143,26	2,27	17	6,59	1,74
	DEG m/z 75	17; 17	1,77		16	11,00	1,75
Intercepto	EG m/z 61	17; 17	0,57	2,27	16	42,80	1,75
	DEG m/z 75	17; 17	1,52		16	90,31	1,75

Como pode-se observar, as variâncias dos interceptos de CCAS e CCEMBF para os dois analitos não apresentaram diferença estatisticamente significativa, uma vez que o valor de F calculado foi inferior ao F crítico. Já para as inclinações,

as variâncias de CCAS e CCEMBF foram consideradas estatisticamente diferentes no caso de EG (F calculado maior que F crítico); por outro lado, para DEG, tais variâncias foram consideradas equivalentes.

Pela análise da Tabela 13, percebe-se que os resultados de t calculado foram superiores aos valores de t crítico para ambos os analitos, na comparação tanto dos interceptos quanto das inclinações de CCAS e CCEMBF. Logo, para todos os casos, há diferença estatisticamente significativa entre os parâmetros das curvas, o que indica a existência de efeito matriz considerável. Assim, as análises foram feitas empregando-se CCEMBF.

6.3.1.3.2 Efeito matriz nas análises de glicerina, propilenoglicol e xaropes

Ao iniciar o desenvolvimento dos métodos analíticos para as matrizes GLI, PPG e xaropes, suspeitava-se que haveria menor possibilidade de efeito matriz significativo, por se tratarem de amostras com presença menor de compostos que poderiam suprimir ou induzir o sinal analítico. Desta forma, optou-se pela avaliação do efeito matriz mediante a comparação das concentrações determinadas frente à CCAS de amostras de analito em solvente puro e de amostras de analito em matriz, em diferentes concentrações, porque era um método mais prático em que seria possível avaliar esse parâmetro nas três matrizes simultaneamente, construindo-se apenas uma CCAS. Os resultados desta avaliação encontram-se descritos nas Tabelas 14, 15 e 16, para GLI, PPG ou xaropes, respectivamente.

Tabela 14 – Resultados da comparação estatística das concentrações, obtidas mediante emprego de CCAS, de amostras de analito em solvente puro e amostras de analito em matriz fortificadas em quatro níveis de concentração de EG, DEG e MeOH para glicerina.

Analito	Nível de fortificação:	1 mg L ⁻¹		3 mg L ⁻¹		10 mg L ⁻¹		20 mg L ⁻¹		
	Grupos:	Matriz	Solvente	Matriz	Solvente	Matriz	Solvente	Matriz	Solvente	
EG	Concentração média ± DP (mg L ⁻¹):	1,10 ± 0,05	1,09 ± 0,04	2,96 ± 0,16	2,98 ± 0,18	10,04 ± 0,24	10,01 ± 0,29	20,57 ± 0,17	20,55 ± 0,67	
	Comparação das médias das concentrações	t _{calculado} ; GL:	0,75; 10		0,17; 10		0,19; 10		0,08; 5,9	
		t _{crítico} ; GL:	1,81; 10		1,81; 10		1,81; 10		2,01; 5,9	
	Comparação das variâncias	F _{calculado} ; GL 1; GL 2:	1,18; 5; 5		1,20; 5; 5		1,33; 5; 5		14,74; 5; 5	
		F _{crítico} ; GL 1; GL 2:	5,05; 5; 5		5,05; 5; 5		5,05; 5; 5		5,05; 5; 5	
DEG	Concentração média ± DP (mg L ⁻¹):	0,93 ± 0,03	0,91 ± 0,01	2,53 ± 0,06	2,47 ± 0,09	8,52 ± 0,52	8,94 ± 0,26	17,59 ± 0,65	18,13 ± 0,47	
	Comparação das médias das concentrações	t _{calculado} ; GL:	1,462; 10		1,147; 10		1,799; 10		1,661; 10	
		t _{crítico} ; GL:	1,812; 10		1,812; 10		1,812; 10		1,812; 10	
	Comparação das variâncias	F _{calculado} ; GL 1; GL 2:	3,87; 5; 5		2,08; 5; 5		0,25; 5; 5		1,38; 5; 5	
		F _{crítico} ; GL 1; GL 2:	5,05; 5; 5		5,05; 5; 5		5,05; 5; 5		5,05; 5; 5	
MeOH	Concentração média ± DP (mg L ⁻¹):	0,91 ± 0,09	0,91 ± 0,11	2,43 ± 0,09	2,49 ± 0,18	9,83 ± 0,28	9,92 ± 0,28	19,29 ± 0,52	19,14 ± 0,50	
	Comparação das médias das concentrações	t _{calculado} ; GL:	0,05; 10		0,77; 10		0,54; 10		0,52; 10	
		t _{crítico} ; GL:	1,81; 10		1,81; 10		1,81; 10		1,81; 10	
	Comparação das variâncias	F _{calculado} ; GL 1; GL 2:	1,51; 5; 5		4,15; 5; 5		1,05; 5; 5		0,92; 5; 5	
		F _{crítico} ; GL 1; GL 2:	5,05; 5; 5		5,05; 5; 5		5,05; 5; 5		5,05; 5; 5	

Tabela 15 – Resultados da comparação estatística das concentrações, obtidas mediante emprego de CCAS, de amostras de analito em solvente puro e amostras de analito em matriz fortificadas em quatro níveis de concentração de EG, DEG e MeOH para propilenoglicol.

Analito	Nível de fortificação:		1 mg L ⁻¹		3 mg L ⁻¹		10 mg L ⁻¹		20 mg L ⁻¹	
	Grupos:		Matriz	Solvente	Matriz	Solvente	Matriz	Solvente	Matriz	Solvente
EG	Concentração média ± DP (mg L ⁻¹):		0,98 ± 0,04	1,09 ± 0,04	2,76 ± 0,10	2,98 ± 0,18	9,51 ± 0,20	10,01 ± 0,29	19,83 ± 0,57	20,55 ± 0,67
	Comparação das médias das concentrações	$t_{\text{calculado}}$; GL:	4,44; 10		2,63; 10		3,57; 10		2,01; 10	
		$t_{\text{crítico}}$; GL:	1,81; 10		1,81; 10		1,81; 10		1,81; 10	
	Comparação das variâncias	$F_{\text{calculado}}$; GL 1; GL 2:	0,94; 5; 5		3,28; 5; 5		2,02; 5; 5		1,37; 5; 5	
		$F_{\text{crítico}}$; GL 1; GL 2:	5,05; 5; 5		5,05; 5; 5		5,05; 5; 5		5,05; 5; 5	
DEG	Concentração média ± DP (mg L ⁻¹):		0,97 ± 0,03	0,91 ± 0,01	2,96 ± 0,10	2,47 ± 0,09	8,66 ± 0,12	8,94 ± 0,26	17,51 ± 1,33	18,13 ± 0,47
	Comparação das médias das concentrações	$t_{\text{calculado}}$; GL:	4,50; 10		8,85; 10		2,40; 10		1,09; 10	
		$t_{\text{crítico}}$; GL:	1,81; 10		1,81; 10		1,81; 10		1,81; 10	
	Comparação das variâncias	$F_{\text{calculado}}$; GL 1; GL 2:	3,17; 5; 5		0,94; 5; 5		4,39; 5; 5		2,85; 5; 5	
		$F_{\text{crítico}}$; GL 1; GL 2:	5,05; 5; 5		5,05; 5; 5		5,05; 5; 5		5,05; 5; 5	
MeOH	Concentração média ± DP (mg L ⁻¹):		1,06 ± 0,06	0,91 ± 0,11	2,81 ± 0,21	2,49 ± 0,18	9,45 ± 0,20	9,92 ± 0,28	19,36 ± 0,71	19,14 ± 0,50
	Comparação das médias das concentrações	$t_{\text{calculado}}$; GL:	2,93; 10		2,77; 10		3,30; 10		0,64; 10	
		$t_{\text{crítico}}$; GL:	1,81; 10		1,81; 10		1,81; 10		1,81; 10	
	Comparação das variâncias	$F_{\text{calculado}}$; GL 1; GL 2:	2,80; 5; 5		0,78; 5; 5		2,04; 5; 5		0,50; 5; 5	
		$F_{\text{crítico}}$; GL 1; GL 2:	5,05; 5; 5		5,05; 5; 5		5,05; 5; 5		5,05; 5; 5	

Tabela 16 – Resultados da comparação estatística das concentrações, obtidas mediante emprego de CCAS, de amostras de analito em solvente puro e amostras de analito em matriz fortificadas em três níveis de concentração de EG, DEG e MeOH para xaropes.

Analito	Nível de fortificação:		1 mg L ⁻¹		10 mg L ⁻¹		20 mg L ⁻¹	
	Grupos:		Matriz	Solvente	Matriz	Solvente	Matriz	Solvente
EG	Concentração média ± DP (mg L ⁻¹):		0,98 ± 0,07	0,98 ± 0,08	9,69 ± 0,19	9,86 ± 0,20	19,87 ± 1,08	20,21 ± 1,65
	Comparação das médias das concentrações	$t_{\text{calculado}}$; GL:	0,10; 10		1,48; 10		0,42; 10	
		$t_{\text{crítico}}$; GL:	1,81; 10		1,81; 10		1,81; 10	
	Comparação das variâncias	$F_{\text{calculado}}$; GL 1; GL 2:	0,93; 5; 5		1,20; 5; 5		2,31; 5; 5	
		$F_{\text{crítico}}$; GL 1; GL 2:	5,05; 5; 5		5,05; 5; 5		5,05; 5; 5	
DEG	Concentração média ± DP (mg L ⁻¹):		0,90 ± 0,03	0,88 ± 0,03	8,09 ± 0,23	8,14 ± 0,12	16,17 ± 0,61	15,27 ± 1,11
	Comparação das médias das concentrações	$t_{\text{calculado}}$; GL:	0,94; 10		0,52; 10		1,74; 10	
		$t_{\text{crítico}}$; GL:	1,81; 10		1,81; 10		1,81; 10	
	Comparação das variâncias	$F_{\text{calculado}}$; GL 1; GL 2:	0,92; 5; 5		0,27; 5; 5		0,55; 5; 5	
		$F_{\text{crítico}}$; GL 1; GL 2:	5,05; 5; 5		5,05; 5; 5		5,05; 5; 5	
MeOH	Concentração média ± DP (mg L ⁻¹):		0,98 ± 0,08	0,95 ± 0,06	9,42 ± 0,36	9,66 ± 0,32	16,91 ± 0,77	17,88 ± 1,18
	Comparação das médias das concentrações	$t_{\text{calculado}}$; GL:	0,76; 10		1,19; 10		1,67; 10	
		$t_{\text{crítico}}$; GL:	1,81; 10		1,81; 10		1,81; 10	
	Comparação das variâncias	$F_{\text{calculado}}$; GL 1; GL 2:	0,56; 5; 5		0,78; 5; 5		2,34; 5; 5	
		$F_{\text{crítico}}$; GL 1; GL 2:	5,05; 5; 5		5,05; 5; 5		5,05; 5; 5	

Inicialmente, os dados de concentração foram testados em relação à normalidade, empregando o teste Shapiro-Wilk. Os valores de p foram superiores a 0,05 para todos os grupos analisados, sendo os dados considerados normais.

As variâncias dos dados de concentração, para cada analito, das amostras de analito em solvente ou em matriz, em cada nível de fortificação, foram comparadas por meio de teste F. Em apenas um dos conjuntos de resultados (EG na concentração 20 mg L⁻¹ na matriz GLI), o valor de F calculado foi superior ao F crítico. Assim, apenas para este conjunto de dados, aplicou-se a fórmula para cálculo da estatística t específica no caso de heterogeneidade das variâncias (Equação 12) e, nos demais casos, aplicou-se a Equação 11, que pressupõe homogeneidade das variâncias dos grupos a serem comparados.

Os resultados do estudo para a amostra GLI e de xarope indicam que não há efeito matriz significativo, já que os valores de t calculado, para todas as concentrações analisadas para EG, DEG e MeOH foram sempre inferiores aos valores de t crítico, com 10 graus de liberdade, ao nível de significância de 5%. Desta forma, as análises para GLI e para os xaropes foram feitas empregando-se CCAS.

Por outro lado, os resultados do estudo para a amostra de PPG indica a presença de efeito matriz significativo, já que, à exceção de DEG e MeOH, ambos na concentração 20 mg L⁻¹, todos os demais valores de t calculado para EG, DEG e MeOH foram superiores ao valor de t crítico, com 10 graus de liberdade, ao nível de significância de 5%. Assim, as análises para PPG foram feitas empregando-se CCEMBF.

6.3.2 Linearidade

As curvas de calibração e os gráficos de resíduos obtidos encontram-se nas Figuras 35 e 36, para CCEMBF da cerveja, nas Figuras 37 a 40, para CCAS empregadas para glicerina e xaropes, e nas Figuras 41 a 43, para CCEMBF para propilenoglicol. Como pode ser observado, há uma tendência de maior variação

para resíduos em níveis mais elevados da curva de calibração, situações que são indicativas de heterocedasticidade dos dados.

Os resíduos obtidos a partir da aplicação do MMQO para as curvas de calibração de EG e DEG, foram considerados normais ($p > 0,05$).

A Tabela 17 apresenta os resultados da avaliação estatística da homocedasticidade dos resíduos, por meio de teste F, com o objetivo de definir o melhor modelo para tratamento dos dados, MMQO ou MMQP.

Tabela 17 – Resultados do teste F para avaliação de homocedasticidade dos resíduos.

Matriz	Analito	F _{calculado} (CCAS)	F _{calculado} (CCEMBF)	F _{crítico} ($\alpha= 0,05$)	GL (numerador; denominador)
Cerveja	EG <i>m/z</i> 61	N.A.	499,1	3,44	8 ; 8
	DEG <i>m/z</i> 75	N.A.	276,7	3,44	8 ; 8
Glicerina / Xarope	EG <i>m/z</i> 31	5835	N.A.	3,44	8 ; 8
	EG <i>m/z</i> 61	89,2	N.A.	3,44	8 ; 8
	DEG <i>m/z</i> 75	3755	N.A.	3,44	8 ; 8
	MeOH <i>m/z</i> 15	89	N.A.	3,44	8 ; 8
Propilenoglicol	EG <i>m/z</i> 31	N.A.	523087	3,44	8 ; 8
	DEG <i>m/z</i> 75	N.A.	43157	3,44	8 ; 8
	MeOH <i>m/z</i> 15	N.A.	387	3,44	8 ; 8

Os valores de F calculado foram superiores aos valores de F crítico, logo, rejeita-se a hipótese nula de igualdade das variâncias e conclui-se que as curvas de calibração apresentaram comportamento heterocedástico. Assim, o modelo empregado para construção das curvas de calibração foi o MMQP.

Nenhum dado foi considerado *outlier* tanto para CCAS quanto para CCEMBF, para todas as matrizes consideradas.

Para o teste de independência de resíduos, os valores da estatística D calculados foram comparados com os limites superior (D_U) e inferior (D_L) constantes na tabela elaborada por Savin e White. Para o número de dados avaliados, os limites tabelados foram 1,5230 e 1,598 para D_L e D_U , respectivamente. Se $D > D_U$, não existe correlação; se $D < D_L$ existe uma

correlação positiva; se D estiver entre os dois limites, o teste é inconclusivo. Todas as curvas de calibração avaliadas apresentaram valores de D calculado superior ao D_U , o que indica não haver evidência de que os resíduos dos modelos de regressão estejam correlacionados ao nível de significância de 5%.

As equações da reta obtidas para cada curva combinada a partir de três preparos diferentes, para todos os analitos, constam na Tabela 18.

Tabela 18 – Equações da curva obtidas no estudo de linearidade de CCAS e CCEMBF.

Matriz	Analito	Equação da curva
Cerveja (CCEMBF)	EG <i>m/z</i> 61	$0,0039x + 0,0022$
	DEG <i>m/z</i> 75	$0,0625x + 0,0245$
Glicerina / Xarope (CCAS)	EG <i>m/z</i> 31	$0,1603x - 0,0110$
	EG <i>m/z</i> 61	$0,0004x + 0,0040$
	DEG <i>m/z</i> 75	$0,0747x - 0,0070$
	MeOH <i>m/z</i> 15	$0,0088x + 0,0063$
Propilenoglicol (CCEMBF)	EG <i>m/z</i> 31	$0,1576x - 0,01745$
	DEG <i>m/z</i> 75	$0,0693x + 0,0133$
	MeOH <i>m/z</i> 15	$0,0141x + 0,0097$

Os resultados dos coeficientes de determinação e correlação e da estatística t estão descritos na Tabela 19 para a curva combinada e para todos os analitos.

Quanto maior o valor de r_w , mais forte é a correlação entre as duas variáveis e mais realista é o modelo (equação) proposto. Conforme pode-se observar na Tabela 19, todos os valores de r_w foram superiores ao valor mínimo para o coeficiente de correlação, que é de 0,990 conforme RDC da ANVISA n° 166, de 24 de julho de 2017 (BRASIL, 2017).

Mais importante que a determinação dos valores de r_w e r_w^2 , é a análise estatística que compara o valor de t_{rw} com o t_{rw} crítico para avaliação da linearidade das curvas de calibração. Pela análise da Tabela 19, pode-se verificar que os valores calculados de t_{rw} foram superiores aos valores de $t_{crítico}$ bilateral, para nível de confiança de 95% e [(I x J)-2] graus de liberdade. Logo,

a hipótese nula, na qual r_w é estatisticamente igual a zero, pode ser descartada e as faixas das curvas de calibração podem ser consideradas lineares.

Tabela 19 – Parâmetros obtidos para o estudo de linearidade de CCAS e CCEMBF – estatística t_{rw} e coeficientes de correlação (r_w) e de determinação (r_w^2).

Matriz	Curva	Analito	t_{rw}	$t_{\text{crítico}}$ ($\alpha=0,05$)	r_w	r_w^2
Cerveja	CCEMBF	EG <i>m/z</i> 61	27,57	2,12	0,990	0,979
		DEG <i>m/z</i> 75	34,86	2,12	0,993	0,987
Glicerina / Xarope	CCAS	EG <i>m/z</i> 31	86,48	2,12	0,999	0,998
		EG <i>m/z</i> 61	143,34	2,12	1,000	0,999
		DEG <i>m/z</i> 75	142,69	2,12	0,999	0,999
		MeOH <i>m/z</i> 15	150,07	2,12	1,000	0,999
		EG <i>m/z</i> 31	109,27	2,12	0,999	0,999
Propilenoglicol	CCEMBF	DEG <i>m/z</i> 75	46,61	2,12	0,996	0,992
		MeOH <i>m/z</i> 15	49,52	2,12	0,997	0,993

Figura 35 – CCEMBF independentes (n=3), na matriz cerveja, obtidas pelo MMQO, construídas pelas médias de leituras das triplicatas das respostas instrumentais para EG (m/z 61), seguido do respectivo gráfico de resíduos.

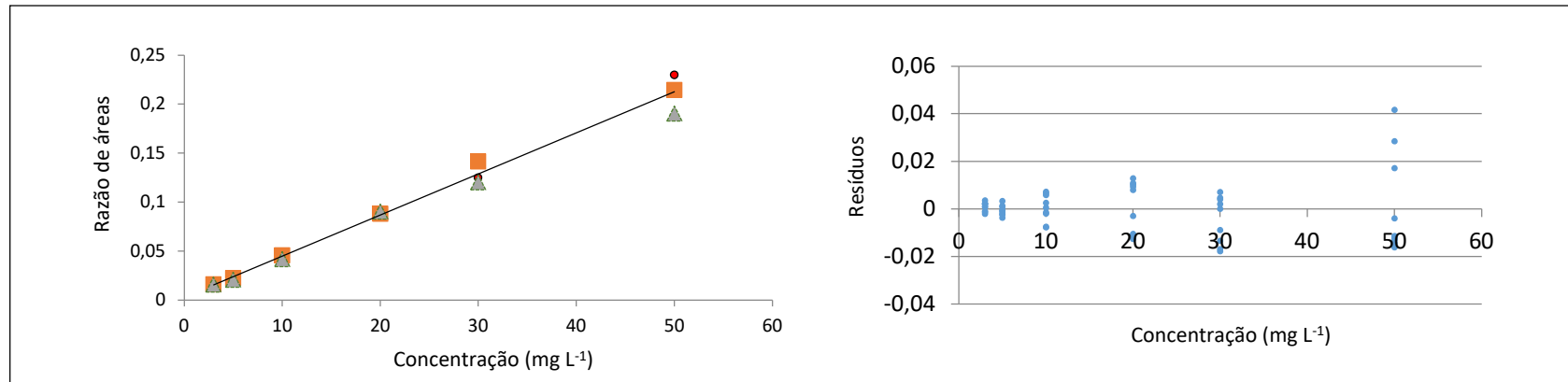


Figura 36 - CCEMBF independentes (n=3), na matriz cerveja, obtidas pelo MMQO, construídas pelas médias de leituras das triplicatas das respostas instrumentais para DEG (m/z 75), seguido do respectivo gráfico de resíduos.

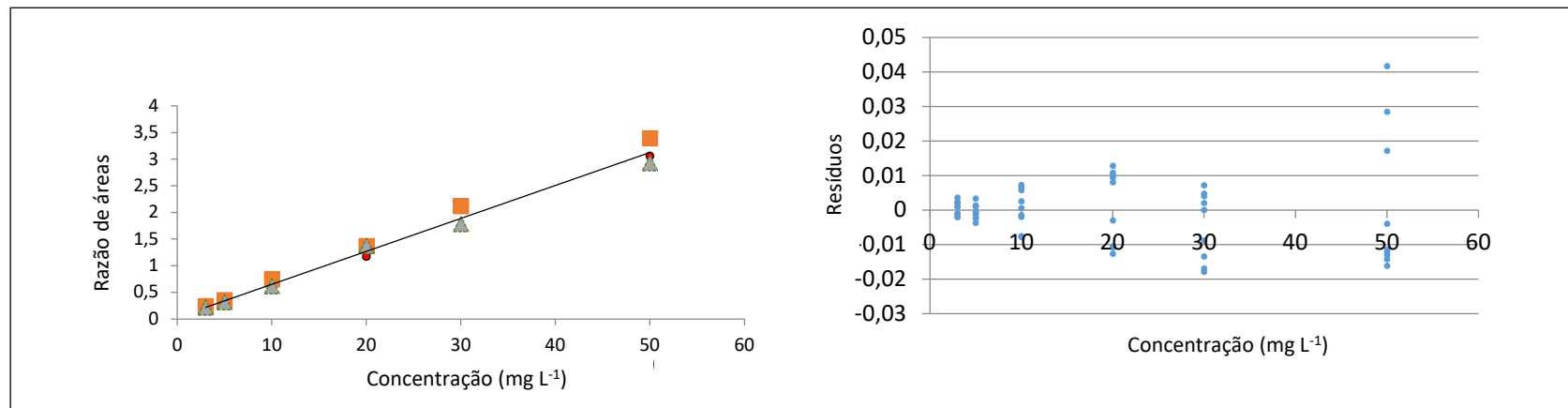


Figura 37 – CCAS independentes (n=3), para análise de glicerina, obtidas pelo MMQO, construídas pelas médias de leituras das triplicatas das respostas instrumentais para EG (m/z 61), seguido do respectivo gráfico de resíduos.

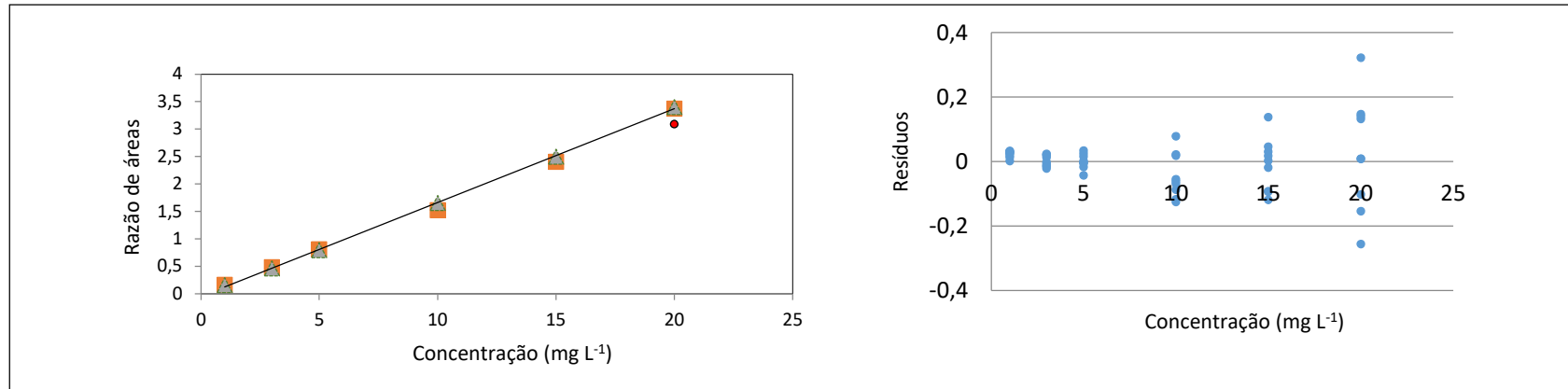


Figura 38 – CCAS independentes (n=3), para análise de xarope, obtidas pelo MMQO, construídas pelas médias de leituras das triplicatas das respostas instrumentais para EG (m/z 31), seguido do respectivo gráfico de resíduos.

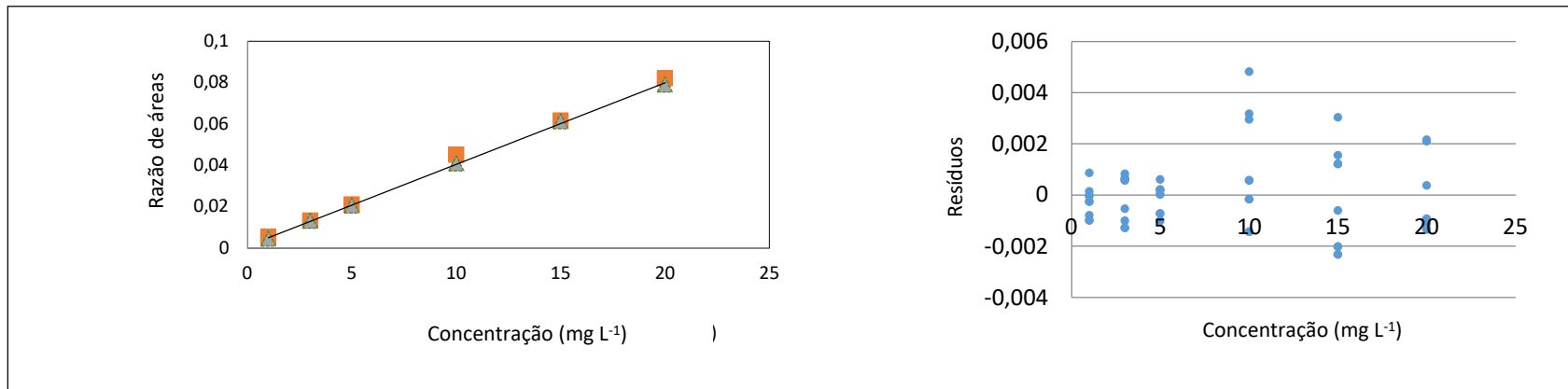


Figura 39 – CCAS independentes (n=3), para análise de glicerina e xarope, obtidas pelo MMQO, construídas pelas médias de leituras das triplicatas das respostas instrumentais para DEG (m/z 75), seguido do respectivo gráfico de resíduos.

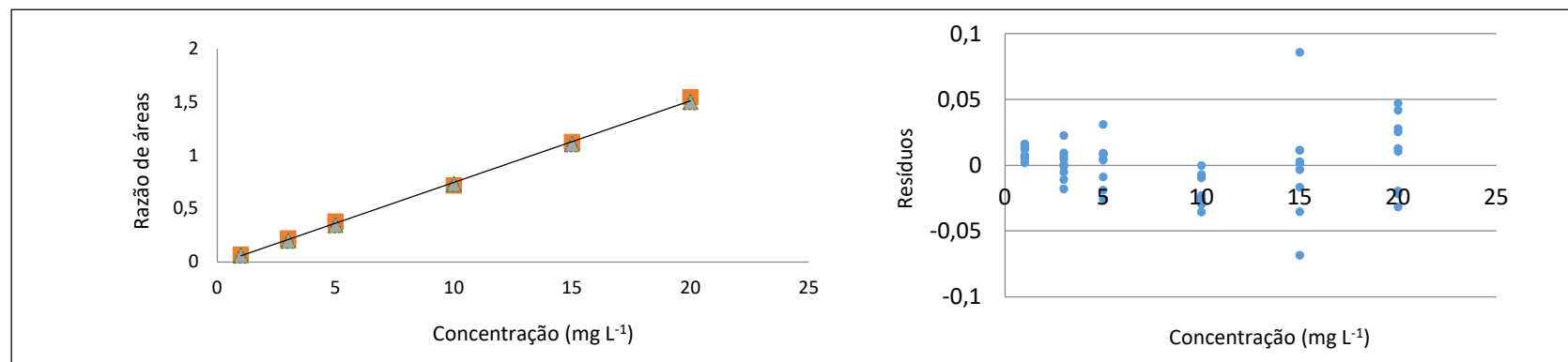


Figura 40 – CCAS independentes (n=3), para análise de glicerina e xarope, obtidas pelo MMQO, construídas pelas médias de leituras das triplicatas das respostas instrumentais para MeOH (m/z 15), seguido do respectivo gráfico de resíduos.

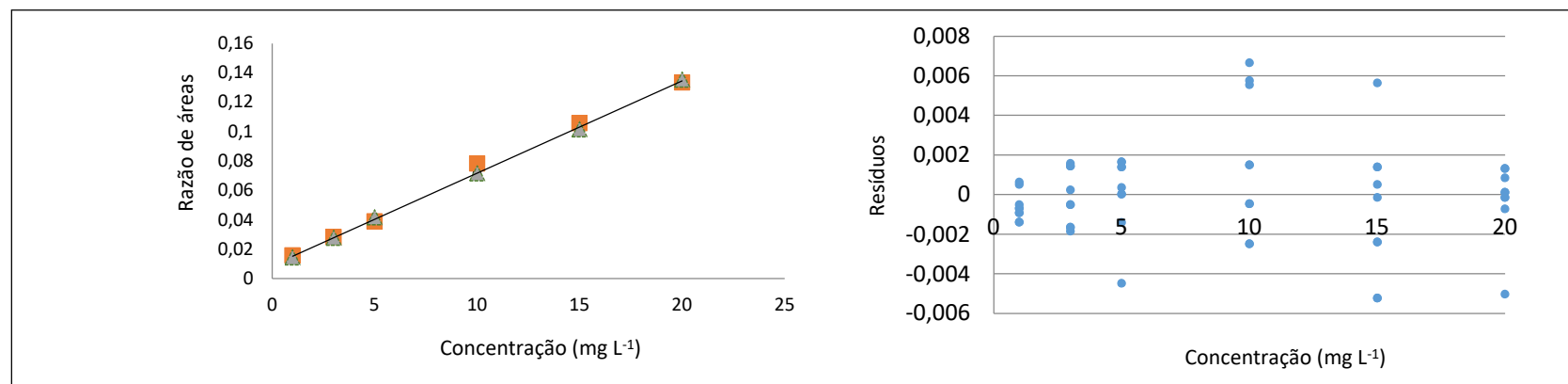


Figura 41 – CCEMBF independentes (n=3), para análise de propilenoglicol, obtidas pelo MMQO, construídas pelas médias de leituras das triplicatas das respostas instrumentais para EG (m/z 61), seguido do respectivo gráfico de resíduos.

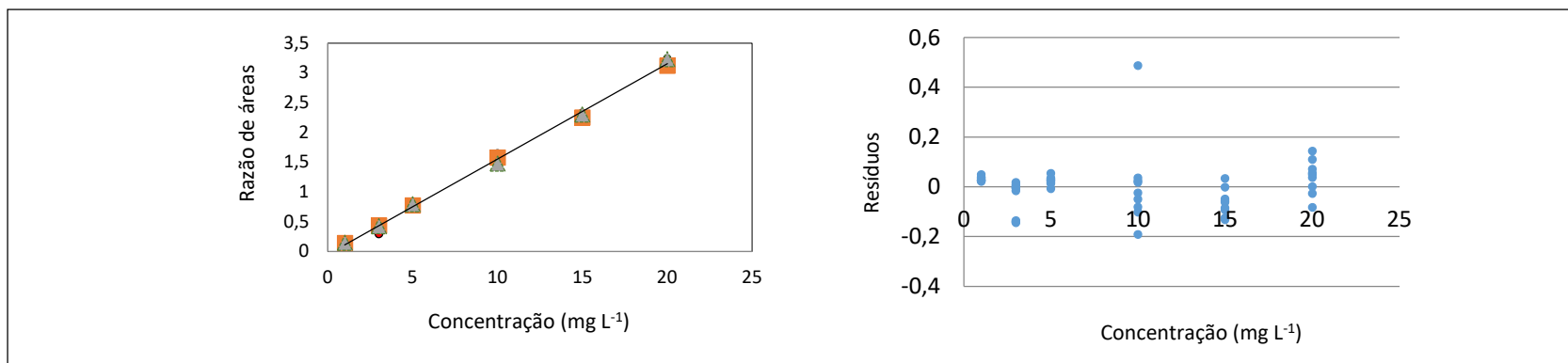


Figura 42 – CCEMBF independentes (n=3), para análise de propilenoglicol, obtidas pelo MMQO, construídas pelas médias de leituras das triplicatas das respostas instrumentais para DEG (m/z 61), seguido do respectivo gráfico de resíduos.

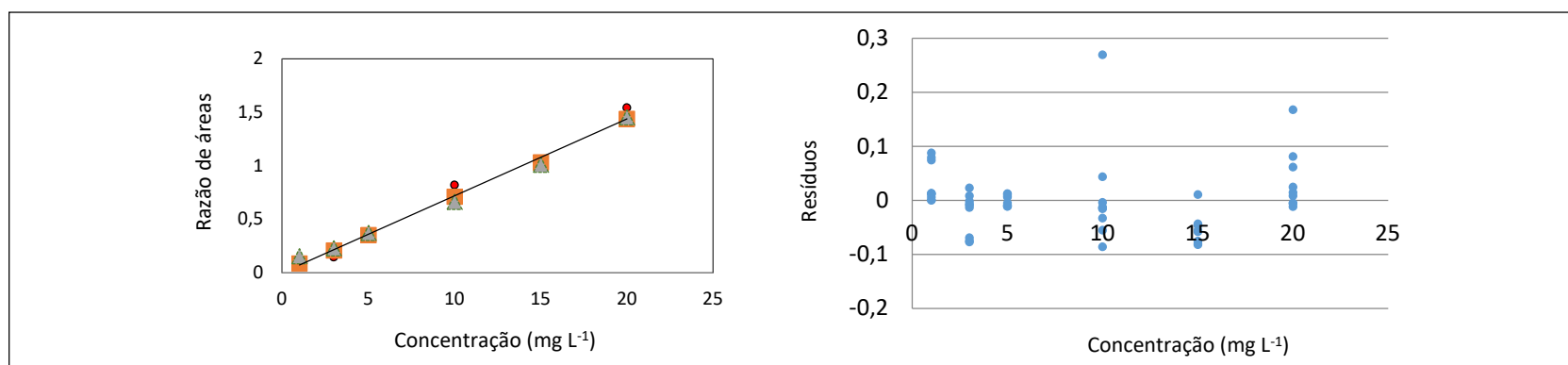
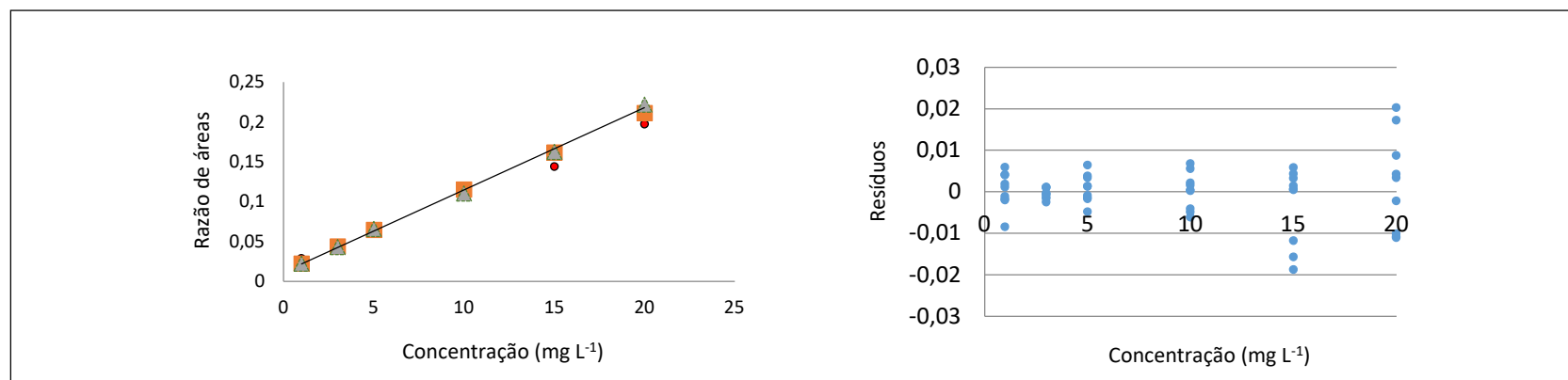


Figura 43 – CCEMBF independentes ($n=3$), para análise de propilenoglicol, obtidas pelo MMQO, construídas pelas médias de leituras das triplicatas das respostas instrumentais para MeOH (m/z 15), seguido do respectivo gráfico de resíduos.



6.3.3 Efeito residual

A Tabela 20 apresenta os resultados do estudo de efeito residual para os íons fragmentos de EG e DEG que apresentaram efeito residual em CCAS e CCEMBF, que foram EG m/z 31 e DEG m/z 75.

Cabe ressaltar que para EG, o íon quantificador para cerveja e para xarope (m/z 61) não apresentou efeito residual, nem na maior concentração da curva de calibração.

O PI também não apresentou efeito residual, estando de acordo com o critério preconizado na RDC 27/212 (BRASIL, 2012) de que as respostas de picos interferentes no TR do PI devem ser inferiores a 5% da resposta do PI.

Os resultados do estudo de efeito residual demonstram que, com a adoção do protocolo de injeção adotado, a ocorrência de efeito residual não é significativa em nenhum dos analitos, uma vez que o percentual em área do pico em relação ao LIC é sempre consideravelmente inferior ao limite de 20% preconizado na RDC.

Além disso, cabe ressaltar que mesmo que ainda seja possível a detecção de picos dos analitos após o procedimento de limpeza, os analitos residuais estão em concentração abaixo do valor definido como do limite de detecção do método, de tal forma que resultados falso positivos são evitados.

É importante mencionar que os resultados do estudo de efeito residual são referentes ao equipamento empregado nas análises de EG e DEG para a cerveja. Para as análises de GLI, PPG e xaropes foi empregado outro sistema de GC-MS, que tem injetor de outro modelo. Para este sistema, o efeito residual não foi observado na faixa de concentração da análise (1 a 20 mg L⁻¹).

Tabela 20 – Resultados do estudo de efeito residual para EG e DEG.

Amostra injetada	CCAS						CCEMBF					
	% em área em relação à área média de EG <i>m/z</i> 31 no LIC			% em área em relação à área média de DEG <i>m/z</i> 75 no LIC			% em área em relação à área média de EG <i>m/z</i> 31 no LIC			% em área em relação à área média de DEG <i>m/z</i> 75 no LIC		
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 1	Rep 2	Rep 3
1° branco após padrão 50 mg L ⁻¹	12	20	17	8	12	15	9	10	10	14	21	16
2° branco após padrão 50 mg L ⁻¹	6	8	78	5	N.A. ¹	4	5	6	6	9	7	8
1° branco após padrão 40 mg L ⁻¹	9	13	15	7	7	12	10	11	11	18	14	19
2° branco após padrão 40 mg L ⁻¹	6	8	12	3	N.A. ¹	8	5	6	6	N.A. ¹	N.A. ¹	11
1° branco após padrão 30 mg L ⁻¹	12	15	15	6	10	11	6	9	11	12	17	13
2° branco após padrão 30 mg L ⁻¹	8	9	8	4	N.A. ¹	N.A. ¹	5	4	4	5	6	7
Branco após padrão 20 mg L ⁻¹	9	12	16	5	8	8	7	7	8	11	15	10
Branco após padrão 10 mg L ⁻¹	9	11	10	4	5	6	7	5	5	7	5	N.A. ¹
Branco após padrão 5 mg L ⁻¹	7	8	8	N.A. ¹	N.A. ¹	N.A. ¹	5	6	5	N.A. ¹	7	8
Branco após padrão 3 mg L ⁻¹	8	10	9	N.A. ¹	N.A. ¹	N.A. ¹	6	5	6	N.A. ¹	N.A. ¹	4,7

N.A.¹ : Não se aplica; nesses casos não foi detectado sinal do analito ou este se confunde com o ruído instrumental; Rep = Replicata.

6.3.4 Exatidão e Precisão

Os resultados do estudo de exatidão estão descritos nas Tabelas 21 a 31, enquanto os resultados da avaliação da precisão constam nas Tabelas 32 a 42.

Conforme pode-se observar, todos os analitos atenderam ao critério de exatidão, uma vez que os valores das diferenças percentuais dos valores preditos com as médias dos resultados obtidos experimentalmente foram inferiores a 20% para todos os níveis de fortificação e para todas as matrizes avaliadas.

Para precisão, todos os resultados experimentais de repetibilidade e precisão intermediária, em todas as matrizes avaliadas, atenderam ao critério de aceitação, pois nenhum deles ultrapassou o DPR máximo definido pela equação de Horwitz.

Tabela 21 – Resultados do estudo de exatidão para EG (*m/z* 61) para análise de cerveja.

Dia de experimento	Nível de fortificação 3 mg L ⁻¹		Nível de fortificação 5 mg L ⁻¹		Nível de fortificação 20 mg L ⁻¹		Nível de fortificação 50 mg L ⁻¹	
	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)
Dia 1	2,802	93,4	5,098	102,0	19,045	95,2	46,368	92,7
	3,178	105,9	4,531	90,6	18,850	94,2	44,089	88,2
	2,611	87,0	5,710	114,2	17,138	85,7	44,351	88,7
	2,831	94,4	5,164	103,2	17,796	89,0	45,807	91,6
	2,926	97,5	5,705	114,1	17,951	89,8	44,490	89,0
	2,863	95,4	5,021	100,4	17,872	89,4	45,922	91,8
Dia 2	2,854	95,1	4,334	86,7	17,095	85,5	47,841	95,7
	2,936	97,9	4,453	89,1	16,620	83,1	46,796	93,6
	2,969	99,0	4,934	98,7	16,210	81,1	47,404	94,8
	2,594	86,5	4,183	83,7	16,808	84,0	45,534	91,1
	2,548	84,9	4,364	87,3	17,042	85,2	48,486	97,0
	3,054	101,8	4,669	93,4	16,773	83,9	49,002	98,0
Dia 3	2,485	82,8	4,392	87,8	16,250	81,3	46,598	93,2
	2,810	93,7	4,032	80,6	17,835	89,2	48,889	97,8
	2,486	82,9	4,438	88,8	16,577	82,9	47,649	95,3
	2,413	80,4	4,826	96,5	16,149	80,7	49,529	99,1
	2,495	83,2	4,460	89,2	16,570	82,9	48,902	97,8
	2,751	91,7	5,003	100,1	16,545	82,7	48,040	96,1
Média	2,756	91,9	4,740	94,8	17,174	85,9	46,983	94,0
Diferença entre valor predito e média experimental (%)	8,1		5,2		14,1		6,0	

Tabela 22 – Resultados do estudo de exatidão para DEG (*m/z* 75) para análise de cerveja.

Dia de experimento	Nível de fortificação 3 mg L ⁻¹		Nível de fortificação 5 mg L ⁻¹		Nível de fortificação 20 mg L ⁻¹		Nível de fortificação 50 mg L ⁻¹	
	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)
Dia 1	2,631	87,7	5,516	110,3	22,797	114,0	52,072	104,1
	2,890	96,3	4,550	91,0	20,610	103,1	56,047	112,1
	2,597	86,6	5,615	112,3	21,114	105,6	55,745	111,5
	2,648	88,3	4,923	98,5	20,391	102,0	57,674	115,3
	2,489	83,0	5,461	109,2	20,119	100,6	56,147	112,3
	2,749	91,6	5,274	105,5	19,809	99,0	52,737	105,5
Dia 2	3,039	101,3	4,657	93,1	20,275	101,4	59,188	118,4
	2,745	91,5	4,662	93,2	18,714	93,6	52,700	105,4
	2,715	90,5	4,664	93,3	19,916	99,6	57,128	114,3
	2,639	88,0	4,560	91,2	19,685	98,4	54,682	109,4
	2,562	85,4	4,777	95,5	20,584	102,9	55,204	110,4
	2,703	90,1	4,896	97,9	19,775	98,9	53,167	106,3
Dia 3	3,263	108,8	4,920	98,4	19,499	97,5	49,403	98,8
	3,185	106,2	4,951	99,0	20,757	103,8	54,961	109,9
	3,157	105,2	5,739	114,8	19,818	99,1	53,863	107,7
	2,886	96,2	5,382	107,6	18,871	94,4	54,364	108,7
	2,774	92,5	5,111	102,2	19,317	96,6	52,696	105,4
	3,143	104,8	5,086	101,7	19,645	98,2	52,753	105,5
Média	2,823	94,1	5,041	100,8	20,094	100,5	54,474	108,9
Diferença entre valor predito e média experimental (%)	5,9		0,8		0,5		8,9	

Tabela 23 – Resultados do estudo de exatidão para EG (*m/z* 31) para análise de glicerina.

Dia de experimento	Nível de fortificação 1 mg L ⁻¹		Nível de fortificação 10 mg L ⁻¹		Nível de fortificação 20 mg L ⁻¹	
	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)
Dia 1	1,167	116,7	10,101	101,0	20,774	103,9
	1,113	111,3	10,170	101,7	20,273	101,4
	1,116	111,6	9,746	97,5	20,685	103,4
	1,073	107,3	10,036	100,4	20,660	103,3
	1,020	102,0	10,443	104,4	20,623	103,1
	1,169	116,9	9,741	97,4	20,408	102,0
Dia 2	0,975	97,5	11,112	111,1	20,366	101,8
	0,908	90,8	9,769	97,7	19,531	97,7
	0,897	89,7	9,275	92,7	18,772	93,9
	0,919	91,9	9,592	95,9	20,662	103,3
	0,972	97,2	9,906	99,1	20,840	104,2
	0,903	90,3	10,052	100,5	20,208	101,0
Dia 3	0,960	96,0	9,677	96,8	20,588	102,9
	1,017	101,7	11,732	117,3	19,678	98,4
	1,058	105,8	9,782	97,8	22,223	111,1
	0,967	96,7	10,807	108,1	19,568	97,8
	1,107	110,7	10,070	100,7	21,065	105,3
	1,001	100,1	10,303	103,0	20,340	101,7
Média	1,019	101,9	10,129	101,3	20,404	102,0
Diferença entre valor predito e média experimental (%)	1,9		1,3		2,0	

Tabela 24 – Resultados do estudo de exatidão para DEG (m/z 75) para análise de glicerina.

Dia de experimento	Nível de fortificação 1 mg L ⁻¹		Nível de fortificação 10 mg L ⁻¹		Nível de fortificação 20 mg L ⁻¹	
	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)
Dia 1	1,009	100,9	8,149	81,5	16,558	82,8
	0,918	91,8	8,455	84,6	16,892	84,5
	0,915	91,5	8,109	81,1	17,662	88,3
	0,922	92,2	8,158	81,6	18,297	91,5
	0,923	92,3	8,624	86,2	18,055	90,3
	0,914	91,4	8,334	83,3	18,085	90,4
Dia 2	0,827	82,7	9,641	96,4	19,267	96,3
	0,832	83,2	8,242	82,4	18,367	91,8
	0,828	82,8	8,046	80,5	17,931	89,7
	0,900	90,0	8,073	80,7	19,355	96,8
	0,908	90,8	8,284	82,8	19,548	97,7
Dia 3	0,863	86,3	8,456	84,6	18,871	94,4
	1,083	108,3	9,435	94,4	17,298	86,5
	1,086	108,6	10,977	119,8	16,581	82,9
	1,093	109,3	9,597	96,0	18,826	94,1
	1,029	102,9	10,443	104,4	16,458	82,3
	1,192	119,2	9,774	97,7	17,306	86,5
Média	1,080	108,0	10,040	100,4	16,704	83,5
	0,962	96,2	8,936	89,4	17,892	89,5
Diferença entre valor predito e média experimental (%)	3,8		10,6		10,5	

Tabela 25 – Resultados do estudo de exatidão para MeOH (*m/z* 15) para análise de glicerina.

Dia de experimento	Nível de fortificação 1 mg L ⁻¹		Nível de fortificação 10 mg L ⁻¹		Nível de fortificação 20 mg L ⁻¹	
	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)
Dia 1	1,070	107,0	9,666	96,7	19,920	99,6
	0,808	80,8	9,913	99,1	18,507	92,5
	0,959	95,9	9,564	95,6	19,259	96,3
	0,928	92,8	9,741	97,4	19,921	99,6
	0,853	85,3	10,405	104,1	18,842	94,2
	0,853	85,3	9,684	96,8	19,296	96,5
Dia 2	0,942	94,2	8,592	85,9	17,695	88,5
	0,847	84,7	9,412	94,1	18,019	90,1
	0,809	80,9	9,183	91,8	17,733	88,7
	0,871	87,1	9,456	94,6	18,073	90,4
	0,805	80,5	9,409	94,1	17,755	88,8
	0,810	81,0	9,044	90,4	16,999	85,0
Dia 3	1,006	100,6	9,637	96,4	21,199	106,0
	1,025	102,5	12,002	120,0	20,037	100,2
	0,961	96,1	10,137	101,4	23,144	115,7
	1,001	100,1	10,927	109,3	21,153	105,8
	1,203	120,3	10,675	106,8	22,123	110,6
	1,101	110,1	11,215	112,1	21,035	105,2
Média	0,936	93,6	9,926	99,3	19,484	97,4
Diferença entre valor predito e média experimental (%)	6,4		0,7		2,6	

Tabela 26 – Resultados do estudo de exatidão para EG (*m/z* 31) para análise de propilenoglicol.

Dia de experimento	Nível de fortificação 1 mg L ⁻¹		Nível de fortificação 10 mg L ⁻¹		Nível de fortificação 20 mg L ⁻¹	
	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)
Dia 1	1,030	103,0	9,865	98,7	20,404	102,0
	0,947	94,7	9,809	98,1	20,092	100,5
	1,010	101,0	9,699	97,0	19,890	99,5
	0,855	85,5	9,925	99,3	20,430	102,1
	0,871	87,1	10,078	100,8	19,966	99,8
	0,957	95,7	9,933	99,3	20,044	100,2
Dia 2	1,050	105,0	9,822	98,2	20,603	103,0
	1,062	106,2	8,908	89,1	18,310	91,6
	1,042	104,2	8,971	89,7	20,007	100,0
	1,100	110,0	9,153	91,5	19,972	99,9
	1,083	108,3	9,991	99,9	19,859	99,3
	1,054	105,4	10,067	100,7	20,510	102,5
Dia 3	1,063	106,3	10,300	103,0	20,803	104,0
	0,940	94,0	9,919	99,2	19,164	95,8
	1,003	100,3	9,917	99,2	20,291	101,5
	1,023	102,3	9,985	99,8	21,882	109,4
	1,019	101,9	10,227	102,3	19,902	99,5
	0,981	98,1	10,370	103,7	20,538	102,7
Média	1,005	100,5	9,830	98,3	20,007	100,7
Diferença entre valor predito e média experimental (%)	0,5		1,7		0,0	

Tabela 27 – Resultados do estudo de exatidão para DEG (*m/z* 75) para análise de propilenoglicol.

Dia de experimento	Nível de fortificação 1 mg L ⁻¹		Nível de fortificação 10 mg L ⁻¹		Nível de fortificação 20 mg L ⁻¹	
	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)
Dia 1	1,148	114,8	8,450	84,5	18,418	92,1
	1,087	108,7	8,572	85,7	18,565	92,8
	1,119	111,9	8,627	86,3	18,913	94,6
	1,111	111,1	8,771	87,7	19,039	95,2
	1,138	113,8	8,822	88,2	18,932	94,7
	1,201	120,1	8,683	86,8	19,006	95,0
Dia 2	1,000	100,0	8,021	80,2	17,829	89,1
	0,835	83,5	8,190	81,9	16,157	80,8
	0,825	82,5	8,249	82,5	17,561	87,8
	0,818	81,8	8,515	85,1	18,459	92,3
	0,860	86,0	8,681	86,8	17,700	88,5
Dia 3	0,827	82,7	9,004	90,0	18,456	92,3
	1,320	132,0	8,730	87,3	17,992	90,0
	1,029	102,9	8,875	88,7	17,384	86,9
	1,040	104,0	8,666	86,7	18,251	91,3
	0,956	95,6	8,669	86,7	20,042	100,2
	0,931	93,1	8,905	89,1	18,474	92,4
Média	0,864	86,4	9,113	91,1	19,221	96,1
Diferença entre valor predito e média experimental (%)	1,006	100,6	8,641	86,4	18,335	91,8
	0,6		13,6		8,2	

Tabela 28 – Resultados do estudo de exatidão para MeOH (*m/z* 15) para análise de propilenoglicol.

Dia de experimento	Nível de fortificação 1 mg L ⁻¹		Nível de fortificação 10 mg L ⁻¹		Nível de fortificação 20 mg L ⁻¹	
	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)
Dia 1	0,877	87,7	9,700	97,0	19,023	95,1
	0,801	80,1	9,436	94,4	19,525	97,6
	0,877	87,7	9,529	95,3	18,145	90,7
	0,803	80,3	9,437	94,4	19,273	96,4
	0,893	89,3	9,637	96,4	18,558	92,8
	0,780	78,0	9,797	98,0	19,080	95,4
Dia 2	0,963	96,3	9,193	91,9	19,318	96,6
	0,902	90,2	9,090	90,9	17,616	88,1
	1,057	105,7	8,908	89,1	19,453	97,3
	1,044	104,4	9,017	90,2	20,145	100,7
	1,099	109,9	9,430	94,3	19,471	97,4
	1,008	100,8	9,461	94,6	20,138	100,7
Dia 3	1,009	100,9	9,850	98,5	19,636	98,2
	0,892	89,2	9,716	97,2	16,979	84,9
	0,861	86,1	9,801	98,0	18,895	94,5
	0,946	94,6	9,277	92,8	20,540	102,7
	0,805	80,5	9,571	95,7	17,798	89,0
	0,894	89,4	10,062	100,6	19,504	97,5
Média	0,917	91,7	9,495	95,0	19,061	95,3
Diferença entre valor predito e média experimental (%)	8,3		5,0		4,7	

Tabela 29 – Resultados do estudo de exatidão para EG (*m/z* 61) para análise de xarope.

Dia de experimento	Nível de fortificação 1 mg L ⁻¹		Nível de fortificação 10 mg L ⁻¹		Nível de fortificação 20 mg L ⁻¹	
	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)
Dia 1	0,964	96,4	9,991	99,9	21,969	109,8
	0,997	99,7	9,434	94,3	19,633	98,2
	1,087	108,7	9,850	98,5	19,582	97,9
	0,909	90,9	9,724	97,2	19,243	96,2
	0,879	87,9	9,554	95,5	18,487	92,4
	1,051	105,1	9,609	96,1	20,320	101,6
Dia 2	0,944	94,4	9,647	96,5	19,430	97,2
	0,849	84,9	9,767	97,7	18,036	90,2
	0,796	79,6	9,862	98,6	20,482	102,4
	0,973	97,3	9,229	92,3	19,184	95,9
	0,874	87,4	9,207	92,1	18,115	90,6
	0,937	93,7	9,823	98,2	18,237	91,2
Dia 3	0,938	93,8	9,114	91,1	19,149	95,7
	0,935	93,5	8,703	87,0	18,383	91,9
	0,860	86,0	8,116	81,2	14,757	73,8
	0,953	95,3	9,189	91,9	18,078	90,4
	0,907	90,7	8,648	86,5	19,245	96,2
	0,874	87,4	8,911	89,1	19,531	97,7
Média	0,929	92,9	9,354	93,5	18,992	95,0
Diferença entre valor predito e média experimental (%)	7,1		6,5		5,0	

Tabela 30 – Resultados do estudo de exatidão para DEG (*m/z* 75) para análise de xarope.

Dia de experimento	Nível de fortificação 1 mg L ⁻¹		Nível de fortificação 10 mg L ⁻¹		Nível de fortificação 20 mg L ⁻¹	
	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)
Dia 1	0,936	93,6	8,241	82,4	17,410	87,1
	0,862	86,2	7,900	79,0	15,943	79,7
	0,869	86,9	7,986	79,9	15,935	79,7
	0,934	93,4	7,905	79,0	15,591	78,0
	0,927	92,7	7,943	79,4	15,741	78,7
	0,886	88,6	8,542	85,4	16,399	82,0
Dia 2	0,965	96,5	9,049	90,5	16,780	83,9
	0,825	82,5	8,844	88,4	15,384	76,9
	0,802	80,2	9,234	92,3	19,124	95,6
	0,811	81,1	8,752	87,5	17,630	88,2
	0,800	80,0	8,553	85,5	16,227	81,1
	0,812	81,2	8,904	89,0	16,416	82,1
Dia 3	0,804	80,4	9,265	92,6	15,994	80,0
	0,799	79,9	8,585	85,9	16,253	81,3
	0,851	85,1	8,515	85,2	18,231	91,2
	0,979	97,9	9,186	91,9	16,157	80,8
	0,930	93,0	9,078	90,8	16,552	82,8
	1,000	100,0	9,236	92,4	16,392	82,0
Média	0,877	87,7	8,651	86,5	16,564	82,8
Diferença entre valor predito e média experimental (%)	12,3		13,5		17,2	

Tabela 31 – Resultados do estudo de exatidão para MeOH (*m/z* 15) para análise de xarope.

Dia de experimento	Nível de fortificação 1 mg L ⁻¹		Nível de fortificação 10 mg L ⁻¹		Nível de fortificação 20 mg L ⁻¹	
	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)
Dia 1	1,086	108,6	9,471	94,7	18,573	92,9
	0,989	98,9	8,899	89,0	16,621	83,1
	0,839	83,9	9,159	91,6	16,391	82,0
	0,994	99,4	9,819	98,2	16,257	81,3
	1,014	101,4	9,282	92,8	16,800	84,0
	0,932	93,2	9,923	99,2	16,862	84,3
Dia 2	0,937	93,7	10,308	103,1	19,758	98,8
	0,917	91,7	10,114	101,1	18,340	91,7
	0,796	79,6	10,563	105,6	20,014	100,1
	0,870	87,0	9,441	94,4	21,205	106,0
	0,891	89,1	9,725	97,3	16,514	82,6
	0,862	86,2	10,459	104,6	17,263	86,3
Dia 3	1,032	103,2	7,740	77,4	17,619	88,1
	0,671	67,1	7,823	78,2	17,385	86,9
	0,906	90,6	8,004	80,0	17,685	88,4
	0,853	85,3	8,617	86,2	16,300	81,5
	0,846	84,6	8,259	82,6	15,995	80,0
	0,907	90,7	8,204	82,0	17,378	86,9
Média	0,908	90,8	9,212	92,1	17,955	89,8
Diferença entre valor predito e média experimental (%)	9,2		7,9		10,2	

Tabela 32 – Resultados do estudo de precisão para EG (*m/z* 61) para análises de cerveja.

Dia de experimento	Nível de fortificação 3 mg L ⁻¹			Nível de fortificação 5 mg L ⁻¹			Nível de fortificação 20 mg L ⁻¹			Nível de fortificação 50 mg L ⁻¹		
	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	DPR (%)	DPR _{máximo} Horwitz (%)	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	DPR (%)	DPR _{máximo} Horwitz (%)	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	DPR (%)	DPR _{máximo} Horwitz (%)	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	DPR (%)	DPR _{máximo} Horwitz (%)
Repetibilidade (Dia 1)	2,802	6,4	13,6	5,098	8,6	12,6	19,045	3,9	10,2	46,368	2,1	8,9
	3,178			4,531			18,850			44,089		
	2,611			5,710			17,138			44,351		
	2,831			5,164			17,796			45,807		
	2,926			5,705			17,951			44,490		
	2,863			5,021			17,872			45,922		
Repetibilidade (Dia 2)	2,854	7,4	13,6	4,334	6,0	12,6	17,095	1,9	10,2	47,841	2,6	8,9
	2,936			4,453			16,620			46,796		
	2,969			4,934			16,210			47,404		
	2,594			4,183			16,808			45,534		
	2,548			4,364			17,042			48,486		
	3,054			4,669			16,773			49,002		
Repetibilidade (Dia 3)	2,485	6,4	13,6	4,392	7,6	12,6	16,250	3,6	10,2	46,598	2,2	8,9
	2,810			4,032			17,835			48,889		
	2,486			4,438			16,577			47,649		
	2,413			4,826			16,149			49,529		
	2,495			4,460			16,570			48,902		
	2,751			5,003			16,545			48,040		
Precisão Intermediária	---	8,0	13,6		10,1	12,6	---	5,1	10,2	---	3,6	8,9

Tabela 33 – Resultados do estudo de precisão para DEG (*m/z* 75) para análises de cerveja.

Dia de experimento	Nível de fortificação 3 mg L ⁻¹			Nível de fortificação 5 mg L ⁻¹			Nível de fortificação 20 mg L ⁻¹			Nível de fortificação 50 mg L ⁻¹		
	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	DPR (%)	DPR _{máximo} Horwitz (%)	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	DPR (%)	DPR _{máximo} Horwitz (%)	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	DPR (%)	DPR _{máximo} Horwitz (%)	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	DPR (%)	DPR _{máximo} Horwitz (%)
Repetibilidade (Dia 1)	2,631	5,2	13,6	5,516	7,9	12,6	22,797	5,1	10,2	52,072	4,0	8,9
	2,890			4,550			20,610			56,047		
	2,597			5,615			21,114			55,745		
	2,648			4,923			20,391			57,674		
	2,489			5,461			20,119			56,147		
	2,749			5,274			19,809			52,737		
Repetibilidade (Dia 2)	3,039	6,0	13,6	4,657	2,5	12,6	20,275	3,2	10,2	59,188	4,4	8,9
	2,745			4,662			18,714			52,700		
	2,715			4,664			19,916			57,128		
	2,639			4,560			19,685			54,682		
	2,562			4,777			20,584			55,204		
	2,703			4,896			19,775			53,167		
Repetibilidade (Dia 3)	3,263	6,3	13,6	4,920	6,0	12,6	19,499	3,2	10,2	49,403	3,7	8,9
	3,185			4,951			20,757			54,961		
	3,157			5,739			19,818			53,863		
	2,886			5,382			18,871			54,364		
	2,774			5,111			19,317			52,696		
	3,143			5,086			19,645			52,753		
Precisão Intermediária	---	8,4	13,6	---	7,5	12,6	---	4,6	10,2	---	4,3	8,9

Tabela 34 – Resultados do estudo de precisão para EG (*m/z* 31) para análises de glicerina.

Dia de experimento	Nível de fortificação 1 mg L ⁻¹			Nível de fortificação 10 mg.L ⁻¹			Nível de fortificação 20 mg.L ⁻¹		
	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	DPR (%)	DPR _{máximo} Horwitz (%)	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	DPR (%)	DPR _{máximo} Horwitz (%)	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	DPR (%)	DPR _{máximo} Horwitz (%)
Repetibilidade (Dia 1)	1,167	5,1	16,0	10,101	2,7	11,3	20,774	0,9	10,2
	1,113			10,170			20,273		
	1,116			9,746			20,685		
	1,073			10,036			20,660		
	1,020			10,443			20,623		
	1,169			9,741			20,408		
Repetibilidade (Dia 2)	0,975	3,8	16,0	11,112	6,3	11,3	20,366	3,9	10,2
	0,908			9,769			19,531		
	0,897			9,275			18,772		
	0,919			9,592			20,662		
	0,972			9,906			20,840		
	0,903			10,052			20,208		
Repetibilidade (Dia 3)	0,960	5,5	16,0	9,677	7,4	11,3	20,588	4,8	10,2
	1,017			11,732			19,678		
	1,058			9,782			22,223		
	0,967			10,807			19,568		
	1,107			10,070			21,065		
	1,001			10,303			20,340		
Precisão Intermediária	---	8,8	16,0	---	5,8	11,3	---	3,6	10,2

Tabela 35 – Resultados do estudo de precisão para DEG (*m/z* 75) para análises de glicerina.

Dia de experimento	Nível de fortificação 1 mg L ⁻¹			Nível de fortificação 10 mg L ⁻¹			Nível de fortificação 20 mg L ⁻¹		
	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	DPR (%)	DPR _{máximo} Horwitz (%)	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	DPR (%)	DPR _{máximo} Horwitz (%)	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	DPR (%)	DPR _{máximo} Horwitz (%)
Repetibilidade (Dia 1)	1,009	4,0	16,0	8,149	2,5	11,3	16,558	4,0	10,2
	0,918			8,455			16,892		
	0,915			8,109			17,662		
	0,922			8,158			18,297		
	0,923			8,624			18,055		
	0,914			8,334			18,085		
Repetibilidade (Dia 2)	0,827	4,3	16,0	9,641	7,1	11,3	19,267	3,3	10,2
	0,832			8,242			18,367		
	0,828			8,046			17,931		
	0,900			8,073			19,355		
	0,908			8,284			19,548		
	0,863			8,456			18,871		
Repetibilidade (Dia 3)	1,083	4,9	16,0	9,435	5,8	11,3	17,298	5,1	10,2
	1,086			10,977			16,581		
	1,093			9,597			18,826		
	1,029			10,443			16,458		
	1,192			9,774			17,306		
	1,080			10,040			16,704		
Precisão Intermediária	---	11,3	16,0	---	10,4	11,3	---	5,7	10,2

Tabela 36 – Resultados do estudo de precisão para MeOH (*m/z* 15) para análises de glicerina.

Dia de experimento	Nível de fortificação 1 mg L ⁻¹			Nível de fortificação 10 mg L ⁻¹			Nível de fortificação 20 mg L ⁻¹		
	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	DPR (%)	DPR _{máximo} Horwitz (%)	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	DPR (%)	DPR _{máximo} Horwitz (%)	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	DPR (%)	DPR _{máximo} Horwitz (%)
Repetibilidade (Dia 1)	1,070	10,4	16,0	9,666	3,1	11,3	19,920	2,9	10,2
	0,808			9,913			18,507		
	0,959			9,564			19,259		
	0,928			9,741			19,921		
	0,853			10,405			18,842		
	0,853			9,684			19,296		
Repetibilidade (Dia 2)	0,942	6,3	16,0	8,592	3,6	11,3	17,695	2,2	10,2
	0,847			9,412			18,019		
	0,809			9,183			17,733		
	0,871			9,456			18,073		
	0,805			9,409			17,755		
	0,810			9,044			16,999		
Repetibilidade (Dia 3)	1,006	8,4	16,0	9,637	7,7	11,3	21,199	5,0	10,2
	1,025			12,002			20,037		
	0,961			10,137			23,144		
	1,001			10,927			21,153		
	1,203			10,675			22,123		
	1,101			11,215			21,035		
Precisão Intermediária	---	12,3	16,0	---	8,5	11,3	---	8,8	10,2

Tabela 37 – Resultados do estudo de precisão para EG (m/z 31) para análises de propilenoglicol.

Dia de experimento	Nível de fortificação 1 mg L ⁻¹			Nível de fortificação 10 mg L ⁻¹			Nível de fortificação 20 mg L ⁻¹		
	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	DPR (%)	DPR _{máximo} Horwitz (%)	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	DPR (%)	DPR _{máximo} Horwitz (%)	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	DPR (%)	DPR _{máximo} Horwitz (%)
Repetibilidade (Dia 1)	1,030	7,5	16,0	9,865	1,3	11,3	20,404	1,1	10,2
	0,947			9,809			20,092		
	1,010			9,699			19,890		
	0,855			9,925			20,430		
	0,871			10,078			19,966		
	0,957			9,933			20,044		
Repetibilidade (Dia 2)	1,050	2,1	16,0	9,822	5,6	11,3	20,603	4,2	10,2
	1,062			8,908			18,310		
	1,042			8,971			20,007		
	1,100			9,153			19,972		
	1,083			9,991			19,859		
	1,054			10,067			20,510		
Repetibilidade (Dia 3)	1,063	4,1	16,0	10,300	2,0	11,3	20,803	4,5	10,2
	0,940			9,919			19,164		
	1,003			9,917			20,291		
	1,023			9,985			21,882		
	1,019			10,227			19,902		
	0,981			10,370			20,538		
Precisão Intermediária	---	6,8	16,0	---	4,2	11,3	---	3,6	10,2

Tabela 38 – Resultados do estudo de precisão para DEG (*m/z* 75) para análises de propilenoglicol.

Dia de experimento	Nível de fortificação 1 mg L ⁻¹			Nível de fortificação 10 mg L ⁻¹			Nível de fortificação 20 mg L ⁻¹		
	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	DPR (%)	DPR _{máximo} Horwitz (%)	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	DPR (%)	DPR _{máximo} Horwitz (%)	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	DPR (%)	DPR _{máximo} Horwitz (%)
Repetibilidade (Dia 1)	1,148	3,5	16,0	8,450	1,6	11,3	18,418	1,4	10,2
	1,087			8,572			18,565		
	1,119			8,627			18,913		
	1,111			8,771			19,039		
	1,138			8,822			18,932		
	1,201			8,683			19,006		
Repetibilidade (Dia 2)	1,000	8,1	16,0	8,021	4,3	11,3	17,829	4,8	10,2
	0,835			8,190			16,157		
	0,825			8,249			17,561		
	0,818			8,515			18,459		
	0,860			8,681			17,700		
	0,827			9,004			18,456		
Repetibilidade (Dia 3)	1,320	15,5	16,0	8,730	2,0	11,3	17,992	5,1	10,2
	1,029			8,875			17,384		
	1,040			8,666			18,251		
	0,956			8,669			20,042		
	0,931			8,905			18,474		
	0,864			9,113			19,221		
Precisão Intermediária	---	13,4	16,0	---	3,2	11,3	---	4,7	10,2

Tabela 39 – Resultados do estudo de precisão para MeOH (*m/z* 15) para análises de propilenoglicol.

Dia de experimento	Nível de fortificação 1 mg L ⁻¹			Nível de fortificação 10 mg L ⁻¹			Nível de fortificação 20 mg L ⁻¹		
	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	DPR (%)	DPR _{máximo} Horwitz (%)	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	DPR (%)	DPR _{máximo} Horwitz (%)	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	DPR (%)	DPR _{máximo} Horwitz (%)
Repetibilidade (Dia 1)	0,877	5,9	16,0	9,700	1,5	11,3	19,023	2,6	10,2
	0,801			9,436			19,525		
	0,877			9,529			18,145		
	0,803			9,437			19,273		
	0,893			9,637			18,558		
	0,780			9,797			19,080		
Repetibilidade (Dia 2)	0,963	7,0	16,0	9,193	2,4	11,3	19,318	4,8	10,2
	0,902			9,090			17,616		
	1,057			8,908			19,453		
	1,044			9,017			20,145		
	1,099			9,430			19,471		
	1,008			9,461			20,138		
Repetibilidade (Dia 3)	1,009	7,8	16,0	9,850	2,8	11,3	19,636	6,9	10,2
	0,892			9,716			16,979		
	0,861			9,801			18,895		
	0,946			9,277			20,540		
	0,805			9,571			17,798		
	0,894			10,062			19,504		
Precisão Intermediária	---	10,4	16,0	---	3,3	11,3	---	4,9	10,2

Tabela 40 – Resultados do estudo de precisão para EG (*m/z* 61) para análises de xarope.

Dia de experimento	Nível de fortificação 1 mg L ⁻¹			Nível de fortificação 10 mg L ⁻¹			Nível de fortificação 20 mg L ⁻¹		
	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	DPR (%)	DPR _{máximo} Horwitz (%)	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	DPR (%)	DPR _{máximo} Horwitz (%)	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	DPR (%)	DPR _{máximo} Horwitz (%)
Repetibilidade (Dia 1)	0,964	8,2	16,0	9,991	2,1	11,3	21,969	6,0	10,2
	0,997			9,434			19,633		
	1,087			9,850			19,582		
	0,909			9,724			19,243		
	0,879			9,554			18,487		
	1,051			9,609			20,320		
Repetibilidade (Dia 2)	0,944	7,5	16,0	9,647	3,1	11,3	19,430	5,1	10,2
	0,849			9,767			18,036		
	0,796			9,862			20,482		
	0,973			9,229			19,184		
	0,874			9,207			18,115		
	0,937			9,823			18,237		
Repetibilidade (Dia 3)	0,938	4,1	16,0	9,114	4,4	11,3	19,149	9,7	10,2
	0,935			8,703			18,383		
	0,860			8,116			14,757		
	0,953			9,189			18,078		
	0,907			8,648			19,245		
	0,874			8,911			19,531		
Precisão Intermediária	---	7,7	16,0	---	5,4	11,3	---	7,7	10,2

Tabela 41 – Resultados do estudo de precisão para DEG (*m/z* 75) para análises de xarope.

Dia de experimento	Nível de fortificação 1 mg L ⁻¹			Nível de fortificação 10 mg L ⁻¹			Nível de fortificação 20 mg L ⁻¹		
	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	DPR (%)	DPR _{máximo} Horwitz (%)	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	DPR (%)	DPR _{máximo} Horwitz (%)	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	DPR (%)	DPR _{máximo} Horwitz (%)
Repetibilidade (Dia 1)	0,936	3,7	16,0	8,241	3,2	11,3	17,410	4,1	10,2
	0,862			7,900			15,943		
	0,869			7,986			15,935		
	0,934			7,905			15,591		
	0,927			7,943			15,741		
	0,886			8,542			16,399		
Repetibilidade (Dia 2)	0,965	7,7	16,0	9,049	2,7	11,3	16,780	7,7	10,2
	0,825			8,844			15,384		
	0,802			9,234			19,124		
	0,811			8,752			17,630		
	0,800			8,553			16,227		
	0,812			8,904			16,416		
Repetibilidade (Dia 3)	0,804	9,8	16,0	9,265	3,8	11,3	15,994	5,0	10,2
	0,799			8,585			16,253		
	0,851			8,515			18,231		
	0,979			9,186			16,157		
	0,930			9,078			16,552		
	1,000			9,236			16,392		
Precisão Intermediária	---	7,8	16,0	---	5,7	11,3	---	5,8	10,2

Tabela 42 – Resultados do estudo de precisão para MeOH (*m/z* 15) para análises de xarope.

Dia de experimento	Nível de fortificação 1 mg L ⁻¹			Nível de fortificação 10 mg L ⁻¹			Nível de fortificação 20 mg L ⁻¹		
	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	DPR (%)	DPR _{máximo} Horwitz (%)	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	DPR (%)	DPR _{máximo} Horwitz (%)	Concentração determinada (mg L ⁻¹)	DPR (%)	DPR _{máximo} Horwitz (%)
Repetibilidade (Dia 1)	1,086	8,6	16,0	9,471	4,2	11,3	18,573	5,0	10,2
	0,989			8,899			16,621		
	0,839			9,159			16,391		
	0,994			9,819			16,257		
	1,014			9,282			16,800		
	0,932			9,923			16,862		
Repetibilidade (Dia 2)	0,937	5,6	16,0	10,308	4,3	11,3	19,758	9,5	10,2
	0,917			10,114			18,340		
	0,796			10,563			20,014		
	0,870			9,441			21,205		
	0,891			9,725			16,514		
	0,862			10,459			17,263		
Repetibilidade (Dia 3)	1,032	13,6	16,0	7,740	4,0	11,3	17,619	4,2	10,2
	0,671			7,823			17,385		
	0,906			8,004			17,685		
	0,853			8,617			16,300		
	0,846			8,259			15,995		
	0,907			8,204			17,378		
Precisão Intermediária	---	10,6	16,0	---	10,1	11,3	---	8,3	10,2

6.3.5 Limite de detecção e limite de quantificação

Os valores de LD e LQ instrumentais para cada um dos analitos nos diferentes métodos de análise encontram-se descritos na Tabela 43 a seguir.

Tabela 43 – Limites de detecção e quantificação, instrumentais e nas matrizes, para EG, DEG e MeOH em cada método de análise desenvolvido.

Analitos	LD instrumental				LD na matriz			
	Cerveja (mg L ⁻¹)	GLI (mg Kg ⁻¹)	PPG (mg Kg ⁻¹)	Xarope (mg L ⁻¹)	Cerveja (mg L ⁻¹)	GLI (mg Kg ⁻¹)	PPG (mg Kg ⁻¹)	Xarope (mg L ⁻¹)
EG	2	0,25	0,50	0,75	10	50	100	75
DEG	1	0,25	0,25	0,75	5	50	50	75
MeOH	-	0,25	0,25	0,75	-	50	50	75
Analitos	LQ instrumental				LQ na matriz			
	Cerveja (mg L ⁻¹)	GLI (mg Kg ⁻¹)	PPG (mg Kg ⁻¹)	Xarope (mg L ⁻¹)	Cerveja (mg L ⁻¹)	GLI (mg Kg ⁻¹)	PPG (mg Kg ⁻¹)	Xarope (mg L ⁻¹)
EG	3	1	1	1	15	200	200	100
DEG	3	1	1	1	15	200	200	100
MeOH	-	1	1	1	-	200	200	100

A determinação de LD foi feita a partir do menor nível de concentração experimental em que fosse possível a visualização do sinal dos analitos com S/R mínima de três. A determinação do LQ, por sua vez, foi feita a partir dos resultados do estudo de precisão e exatidão. Uma vez que os menores níveis das curvas de calibração dos analitos tiveram sua precisão e exatidão determinadas nesses estudos e que atenderam aos requisitos especificados, o menor limite da curva de calibração foi adotado como LQ do método.

O limite aceitável de DEG em GLI preconizado na farmacopeia europeia é de 0,10% m/m, assim como os limites aceitáveis de EG e DEG em GLI e PPG preconizados na farmacopeia dos EUA (The European, 2019a, The UNITED, 2020a; 2020b), o que equivale a 1.000 mg Kg^{-1} de cada glicol. Desta forma, observa-se que os LQ no presente trabalho, 200 mg Kg^{-1} para todos os analitos, estão dentro da faixa adequada, estando consideravelmente abaixo do limite máximo dos contaminantes na amostra. HOLLOWAY e colaboradores (2010) analisaram EG e DEG em GLI, por GC-FID, reportando valores de LQ calculado de 250 mg L^{-1} . TOKUNAGA e colaboradores (2012) analisaram EG e DEG em GLI e PPG, por GC-FID, apresentando valores de LQ calculado de 100 mg L^{-1} . O fato desses valores de LQ não terem sido determinados experimentalmente, dificulta a comparação. Importante mencionar que nesses trabalhos a concentração de GLI e PPG empregada é dez vezes superior ao do presente trabalho.

Como nos xaropes não haverá apenas GLI e/ou PPG em sua composição, é interessante que seja possível identificar e quantificar os analitos em menor concentração do que nesses excipientes puros, o que ocorreu na prática, alcançando-se valores de LD e LQ iguais a 75 e 100 mg L^{-1} , respectivamente, para todos os analitos em xarope. Comparando-se aos relatos da literatura, BAFFI e colaboradores (2000) encontraram valores de LD e LQ iguais a 150 e 1.000 mg L^{-1} , respectivamente, para DEG em xaropes. Assim, o presente estudo alcançou valores de LD duas vezes inferior e valores de LQ dez vezes inferior aos resultados já reportados na literatura. Em adição, SELF (2013) apresentou apenas os dados de LD e LQ calculados para EG e DEG em xaropes, não sendo estes determinados experimentalmente, o que impossibilita comparação, sendo,

entretanto, importante mencionar que a menor concentração de fortificação dos analitos nesses xaropes, para os estudos de exatidão e precisão, foram iguais a 1.000 mg L⁻¹, valores estes considerados elevados em comparação às concentrações estudadas no presente trabalho.

Já na cerveja, como não se espera a presença dos álcoois tóxicos, o ideal é obter os menores LD e LQ possíveis. Os valores encontrados no presente trabalho mostraram-se adequados considerando o risco desses produtos, levando-se em consideração os valores do LD₅₀ de EG de 1,4 a 1,6 g Kg⁻¹ e do LD₅₀ de DEG de 1,1 g Kg⁻¹ (FOWLES *et al.*, 2017), e a frequência esperada de consumo da cerveja. Assim, os valores encontrados de LD e LQ possibilitam determinar os álcoois tóxicos na cerveja em concentrações consideravelmente abaixo daquelas consideradas de risco.

6.3.6 Estudo de estabilidade

6.3.6.1 Estudo de estabilidade dos analitos em solvente

A Tabela 44 apresenta os resultados do estudo de estabilidade das STmix.

Tabela 44 – Informações e resultados do estudo de estabilidade de STmix 1 mg.L⁻¹.

Analito	Tempo	Média da concentração ± DP (mg L ⁻¹)	Diferença em relação à solução recém-preparada (%)
EG <i>m/z</i> 61	Inicial	1,037 ± 0,095	4,5
	106h	1,086 ± 0,087	
DEG <i>m/z</i> 75	Inicial	0,993 ± 0,053	1,9
	106h	1,012 ± 0,022	

Pelos resultados apresentados na Tabela 44 pode-se concluir que as STmix 1 mg L⁻¹ podem ser consideradas estáveis pelo período estudado, de 106 horas, uma vez que a concentração dos analitos não superou o limite de 5% de variação conforme critério estabelecido em MAPA (2011).

As informações e resultados do estudo de estabilidade de SEMix constam na Tabela 45 a seguir.

Tabela 45 – Informações e resultados do estudo de estabilidade de SEmix 10.000 mg.L⁻¹.

Analito	Data preparo da SEmix	Data da diluição e injeção	Concentração da diluição (mg L ⁻¹)	Área média (analito)	Área média (PI)	Média da razão de áreas	DP da razão de áreas	Diferença em relação à solução recém-preparada (%)
EG <i>m/z</i> 61	10/02/20	01/03/20	30	2953	33544	0,0880	0,0008	0,9
	19/02/20			2792	32861	0,0850	0,0013	4,4
	01/03/20			3160	35635	0,0888	0,0029	---
DEG <i>m/z</i> 75	10/02/20	01/03/20	30	54293	33544	1,619	0,012	4,9
	19/02/20			53607	32861	1,631	0,017	4,1
	01/03/20			60627	35635	1,702	0,008	---

A partir dos resultados expostos na Tabela 45, foi comprovada estabilidade das SEmix na concentração 10.000 mg L⁻¹ por 19 dias. A inspeção visual dos cromatogramas não evidenciou a degradação dos analitos.

6.3.6.2 Estabilidade do padrão interno

A Tabela 46 apresenta os resultados obtidos na avaliação da estabilidade do PI. Observa-se que as ST não apresentaram diferença superior a 5%, sendo consideradas estáveis pelo tempo de estudo, equivalente a 30 dias. A SE também pode ser considerada estável por 30 dias, uma vez que é uma solução mais concentrada e armazenada sob as mesmas condições da ST.

Tabela 46 – Informações e resultados do estudo de estabilidade da ST do padrão interno.

Data preparo da SE 10 mg mL ⁻¹	Data preparo da ST 0,10 mg mL ⁻¹	Data da injeção	Área média do 1,4-BuOH <i>m/z</i> 44	Diferença em relação ao PI recém-preparado (%)
10/02/20	10/02/20	19/02/20	30365	4,9
10/02/20	19/02/20		29594	2,2
19/02/20	19/02/20		28951	---
19/02/20	19/02/20	01/03/20	34796	3,4
01/03/20	01/03/20		33651	---
10/02/20	10/02/20	10/03/20	43829	0,2
19/02/20	19/02/20		42148	3,7
01/03/20	01/03/20		43758	---

Uma vez que a mesma solução do PI é adicionada tanto nas soluções padrão das curvas de calibração, como nas amostras fortificadas ou de concentração desconhecida que compõem a bancada analítica, o impacto da variação das concentrações do PI ao longo do tempo, dentro de uma faixa razoável de variação, não causa impacto significativo na análise. Dessa forma, a importância maior do estudo de estabilidade do PI foi a observação visual dos cromatogramas que, durante todo o estudo, não apresentou qualquer sinal de degradação dessa substância que pudesse comprometer a seletividade do método analítico. Os sinais analíticos mantiveram o formato usual e não foi observada a presença de sinais interferentes.

6.3.6.3 Estabilidade das soluções diluídas de cerveja

Os resultados da análise de estabilidade das soluções diluídas de cerveja em termos de concentração, recuperação e desvio padrão relativo estão descritos na Tabela 47.

Tabela 47 – Concentração, incerteza expandida e recuperação das soluções das amostras fortificadas no LQ, inicial, após 24 e 56 horas de preparo.

Analito / Tempo	EG			DEG		
	Inicial	24 h	56 h	Inicial	24 h	56 h
Concentração média \pm DP (mg L ⁻¹)	17,14 \pm 0,77	17,12 \pm 0,47	17,77 \pm 0,45	12,50 \pm 0,36	12,12 \pm 0,87	12,35 \pm 1,04
Diferença entre valor experimental e predito (%)	14,3	14,1	18,5	16,7	19,2	17,7
DPR (%)	5,4	3,3	3,2	3,3	7,8	8,8
Diferença de concentração em relação ao tempo inicial (%)	---	0,1	3,7	---	3,0	1,2

Pelos resultados apresentados na Tabela 47 pode-se concluir que as soluções diluídas de cerveja podem ser consideradas estáveis pelo período estudado, de 56 horas, uma vez que a concentração dos analitos não superou o limite de 5% de variação conforme critério estabelecido em MAPA (2011).

Os resultados da avaliação estatística comprovaram que os três grupos de dados não diferem entre si ($p > 0,05$), ou seja, as concentrações de EG e DEG das amostras fortificadas no LQ, no momento do preparo e até 56 horas de espera no auto-injetor, não são consideradas diferentes, indicando estabilidade dos soluções. Além disso, a concentração média experimental das amostras, em todos os dias, diferiu do valor previsto (teórico) em menos de 20%, demonstrando exatidão. Os valores de DPR, para todos os dias, também foram inferiores ao valor de DPR máximo de Horwitz, que é de 11% nesse nível de concentração, demonstrando também a precisão das respostas.

6.4 Estimativa da incerteza de medição

Os resultados da avaliação da incerteza percentual de amostras de cerveja, GLI, PPG e xaropes brancos fortificados na concentração do LQ constam nas Tabelas 48 a 51. Como pode-se observar, os valores de incerteza situam-se em torno de 30%.

O modelo para sua estimativa evidenciou que a incerteza devido à estimativa dos parâmetros da regressão linear e devido às medições de massa e de volume da amostra não contribuem de forma significativa para a incerteza final.

Nota-se que as fontes que mais influenciam na incerteza do resultado são a incerteza devido à não correção do resultado pela recuperação, seguida da incerteza devido à precisão intermediária. Juntas, essas duas fontes contribuem com mais de 90% da incerteza combinada. Dessa forma, observa-se que é difícil reduzir a incerteza do resultado, pois os fatores que são decisivos para ela refletem as características de desempenho inerentes ao método. Entretanto, os valores de incerteza alcançados foram considerados adequados, já que são valores usualmente encontrados em métodos que empregam análise instrumental, tendo em vista a grande quantidade de fatores que podem influenciar a medição.

Tabela 48 – Incerteza dos valores de concentração de EG e DEG em amostras de cerveja fortificadas no LQ do método.

Analito	Primeiro dia				Segundo dia				Terceiro dia			
	Resultado (mg L ⁻¹)	U (mg L ⁻¹)	K ($\alpha= 0,05$)	Incerteza percentual	Resultado (mg L ⁻¹)	U (mg L ⁻¹)	k ($\alpha= 0,05$)	Incerteza percentual	Resultado (mg L ⁻¹)	U (mg L ⁻¹)	k ($\alpha= 0,05$)	Incerteza percentual
EG	14,0	4,3	1,96	30,9	14,3	4,5	1,96	31,7	12,4	4,0	1,96	32,4
	15,9	5,0	1,96	31,5	14,7	4,6	1,96	31,7	14,0	4,5	1,96	31,9
	13,0	4,0	1,96	31,0	14,8	4,7	1,96	31,6	12,4	4,0	1,96	32,4
	14,2	4,4	1,96	30,9	13,0	4,2	1,96	32,1	12,1	3,9	1,96	32,6
	14,6	4,5	1,96	30,8	12,7	4,0	1,96	32,1	12,5	4,0	1,96	32,4
	14,3	4,4	1,96	30,9	15,3	4,8	1,96	31,5	13,8	4,4	1,96	32,0
DEG	13,2	3,7	1,96	28,2	15,2	4,3	1,96	28,2	16,3	4,6	1,96	28,2
	14,5	4,1	1,96	28,2	13,7	3,9	1,96	28,2	15,9	4,5	1,96	28,2
	13,0	3,7	1,96	28,2	13,6	3,8	1,96	28,2	15,8	4,4	1,96	28,2
	13,2	3,7	1,96	28,2	13,2	3,7	1,96	28,2	14,4	4,1	1,96	28,2
	12,4	3,5	1,96	28,3	12,8	3,6	1,96	28,3	13,9	3,9	1,96	28,2
	13,7	3,9	1,96	28,2	13,5	3,8	1,96	28,2	15,7	4,4	1,96	28,2

Tabela 49 – Incerteza dos valores de concentração de EG, DEG e MeOH em amostras de GLI fortificadas no LQ do método.

Análito	Primeiro dia				Segundo dia				Terceiro dia			
	Resultado (mg L ⁻¹)	U (mg L ⁻¹)	k (α= 0,05)	Incerteza percentual	Resultado (mg L ⁻¹)	U (mg L ⁻¹)	K (α= 0,05)	Incerteza percentual	Resultado (mg L ⁻¹)	U (mg L ⁻¹)	k (α= 0,05)	Incerteza percentual
EG	233,4	66,5	1,96	28,5	194,9	55,5	1,96	28,5	203,3	57,9	1,96	28,5
	222,6	63,4	1,96	28,5	181,5	51,7	1,96	28,5	211,6	60,3	1,96	28,5
	223,2	63,6	1,96	28,5	179,4	51,1	1,96	28,5	193,4	55,1	1,96	28,5
	214,5	61,1	1,96	28,5	183,7	52,3	1,96	28,5	221,4	63,1	1,96	28,5
	204,1	58,1	1,96	28,5	194,4	55,3	1,96	28,5	200,3	57,0	1,96	28,5
	233,8	66,6	1,96	28,5	180,7	51,5	1,96	28,5	203,3	57,9	1,96	28,5
DEG	201,8	64,0	1,96	31,7	165,5	52,4	1,96	31,7	216,5	68,6	1,96	31,7
	183,5	58,2	1,96	31,7	166,4	52,7	1,96	31,7	217,3	68,9	1,96	31,7
	183,0	58,0	1,96	31,7	165,6	52,5	1,96	31,7	218,6	69,3	1,96	31,7
	184,5	58,5	1,96	31,7	180,0	57,0	1,96	31,7	205,9	65,2	1,96	31,7
	184,6	58,5	1,96	31,7	181,7	57,6	1,96	31,7	238,4	75,5	1,96	31,7
	182,9	58,0	1,96	31,7	172,6	54,7	1,96	31,7	216,0	68,4	1,96	31,7
MeOH	213,9	70,8	1,96	33,1	188,3	62,4	1,96	33,1	201,1	66,6	1,96	33,1
	161,5	53,5	1,96	33,1	169,4	56,1	1,96	33,1	204,9	67,9	1,96	33,1
	191,8	63,5	1,96	33,1	161,9	53,6	1,96	33,1	192,2	63,7	1,96	33,1
	185,6	61,4	1,96	33,1	174,2	57,7	1,96	33,1	200,1	66,3	1,96	33,1
	170,6	56,5	1,96	33,1	161,0	53,4	1,96	33,1	240,5	79,6	1,96	33,1
	170,7	56,5	1,96	33,1	162,0	53,7	1,96	33,1	220,1	72,9	1,96	33,1

Tabela 50 – Incerteza dos valores de concentração de EG, DEG e MeOH em amostras de PPG fortificadas no LQ do método.

Análito	Primeiro dia				Segundo dia				Terceiro dia			
	Resultado (mg L ⁻¹)	U (mg L ⁻¹)	k ($\alpha= 0,05$)	Incerteza percentual	Resultado (mg L ⁻¹)	U (mg L ⁻¹)	k ($\alpha= 0,05$)	Incerteza percentual	Resultado (mg L ⁻¹)	U (mg L ⁻¹)	K ($\alpha= 0,05$)	Incerteza percentual
EG	206,0	54,2	1,96	26,3	210,1	55,2	1,96	26,3	212,6	55,9	1,96	26,3
	189,4	49,8	1,96	26,3	212,4	55,9	1,96	26,3	188,0	49,4	1,96	26,3
	202,0	53,1	1,96	26,3	208,4	54,8	1,96	26,3	200,7	52,8	1,96	26,3
	171,0	45,0	1,96	26,3	220,0	57,8	1,96	26,3	204,5	53,8	1,96	26,3
	174,3	45,8	1,96	26,3	216,6	56,9	1,96	26,3	203,9	53,6	1,96	26,3
	191,4	50,3	1,96	26,3	210,8	52,4	1,96	24,9	196,3	51,6	1,96	26,3
DEG	229,6	79,7	1,96	34,7	200,0	69,4	1,96	34,7	264,0	91,7	1,96	34,7
	217,5	75,5	1,96	34,7	167,0	57,9	1,96	34,7	205,8	71,6	1,96	34,8
	223,7	77,6	1,96	34,7	164,9	57,2	1,96	34,7	208,0	72,3	1,96	34,8
	222,2	77,1	1,96	34,7	163,5	56,7	1,96	34,7	191,2	66,5	1,96	34,8
	227,6	79,0	1,96	34,7	171,9	59,6	1,96	34,7	186,3	64,8	1,96	34,8
	240,3	83,4	1,96	34,7	165,4	57,4	1,96	34,7	172,9	60,2	1,96	34,8
MeOH	175,4	53,6	1,96	30,5	192,6	59,2	1,96	30,8	201,8	62,3	1,96	30,9
	160,2	49,0	1,96	30,6	180,5	55,5	1,96	30,8	178,6	55,2	1,96	30,9
	175,4	53,6	1,96	30,5	211,3	65,0	1,96	30,7	172,2	53,3	1,96	30,9
	160,6	49,1	1,96	30,6	208,9	64,2	1,96	30,7	189,3	58,5	1,96	30,9
	178,7	54,6	1,96	30,5	219,9	67,6	1,96	30,7	161,1	49,9	1,96	31,0
	156,0	47,7	1,96	30,6	201,6	62,0	1,96	30,8	178,8	55,3	1,96	30,9

Tabela 51 – Incerteza dos valores de concentração de EG, DEG e MeOH em amostras de xaropes fortificadas no LQ do método.

Análito	Primeiro dia				Segundo dia				Terceiro dia			
	Resultado (mg L ⁻¹)	U (mg L ⁻¹)	k ($\alpha= 0,05$)	Incerteza percentual	Resultado (mg L ⁻¹)	U (mg L ⁻¹)	k ($\alpha= 0,05$)	Incerteza percentual	Resultado (mg L ⁻¹)	U (mg L ⁻¹)	k ($\alpha= 0,05$)	Incerteza percentual
EG	96,4	26,3	1,96	27,3	94,4	25,9	1,96	27,4	93,8	25,7	1,96	27,3
	99,7	27,2	1,96	27,3	84,9	23,3	1,96	27,5	93,5	25,6	1,96	27,3
	108,7	29,6	1,96	27,2	79,6	21,9	1,96	27,5	86,0	23,5	1,96	27,4
	90,9	24,8	1,96	27,3	97,3	26,7	1,96	27,4	95,3	26,0	1,96	27,3
	87,9	24,0	1,96	27,3	87,4	24,0	1,96	27,5	90,7	24,8	1,96	27,4
	105,1	28,6	1,96	27,2	93,7	25,7	1,96	27,4	93,1	25,5	1,96	27,4
DEG	93,6	25,6	1,96	27,4	96,5	26,7	1,96	27,6	80,4	22,3	1,96	27,7
	86,2	23,6	1,96	27,4	82,5	22,9	1,96	27,8	79,9	22,1	1,96	27,7
	86,9	23,8	1,96	27,4	80,2	22,3	1,96	27,8	85,1	23,5	1,96	27,7
	93,4	25,6	1,96	27,4	81,1	22,5	1,96	27,8	97,9	27,0	1,96	27,6
	92,7	25,4	1,96	27,4	80,0	22,2	1,96	27,8	93,0	25,7	1,96	27,6
	88,6	24,2	1,96	27,4	81,2	22,6	1,96	27,8	100,0	27,6	1,96	27,6
MeOH	108,6	33,5	1,96	30,8	93,7	28,9	1,96	30,8	103,2	31,8	1,96	30,8
	98,9	30,5	1,96	30,8	91,7	28,3	1,96	30,8	67,1	20,7	1,96	30,8
	83,9	25,9	1,96	30,8	79,6	24,6	1,96	30,9	90,6	27,9	1,96	30,8
	99,4	30,6	1,96	30,8	87,0	26,8	1,96	30,8	85,3	26,3	1,96	30,8
	101,4	31,2	1,96	30,8	89,1	27,5	1,96	30,8	84,6	26,0	1,96	30,8
	93,2	28,7	1,96	30,8	86,2	26,6	1,96	30,8	90,7	27,9	1,96	30,8

A incerteza de medição apresenta-se como um parâmetro essencial que deve acompanhar o resultado de uma medição analítica de forma a contemplar as variações inerentes que existem em todo processo de medição. Em termos regulatórios, no caso de análises fiscais, é muito importante a expressão da incerteza de medição do resultado, de forma a assegurar a confiabilidade e a reprodutibilidade do resultado e a rastreabilidade metrológica.

6.5 Análises de amostras de cerveja

A Instrução Normativa (IN) do MAPA nº 65, de 10 de dezembro de 2019, que estabelece os padrões de identidade e qualidade para os produtos de cervejaria, define os ingredientes obrigatórios e opcionais para a cerveja. Os primeiros compreendem a água, o malte ou extrato de malte e o lúpulo (exceto para “cerveja gruit”). Os segundos compreendem os adjuntos cervejeiros; os ingredientes de origem animal, vegetal ou outros ingredientes aptos para consumo humano para alimento, obedecidos os respectivos regulamentos técnicos específicos; e as leveduras e outros microorganismos fermentativos utilizados para modificar e conferir as características típicas próprias da cerveja, desde que garantida sua inocuidade à saúde humana (MAPA, 2019).

Desta forma, existe uma infinidade de composições possíveis para as cervejas, o que é típico de uma matriz complexa, sendo que o método de análise desenvolvido foi satisfatoriamente aplicado a 701 amostras de cerveja, compreendendo 125 diferentes marcas, de diferentes composições que estão descritas no Apêndice A.

Os resultados analíticos apontaram que das 612 amostras de cerveja de um fabricante, 51 apresentaram pelo menos um dos glicóis investigados, o que corresponde a 8% das amostras coletadas deste fabricante.

As amostras de cerveja que apresentaram pelo menos um dos glicóis acima de LQ também estão dispostas na Figura 44, em ordem crescente para o somatório das concentrações de EG e DEG, demonstrando o nível de cada glicol. Das 51 amostras contaminadas, seis estavam contaminadas apenas com DEG em baixo nível de concentração (cinco delas abaixo de LQ) e três amostras estavam

contaminadas apenas com EG em baixa concentração. As outras 42 amostras contaminadas apresentaram EG e DEG em diferentes níveis de concentração. A Figura 45, por sua vez, apresenta um histograma com os resultados dessas 51 amostras contaminadas, no qual, pode-se perceber que a maioria das amostras contaminadas apresenta o total de glicóis acima do LD até 500 mg L⁻¹, mas concentrações mais elevadas também foram encontradas, com um valor máximo de 9.677 mg L⁻¹ para a soma de EG e DEG.

Figura 44 – Resultados analíticos em concentrações crescentes de somatório de EG e DEG em amostras de cervejas contaminadas.

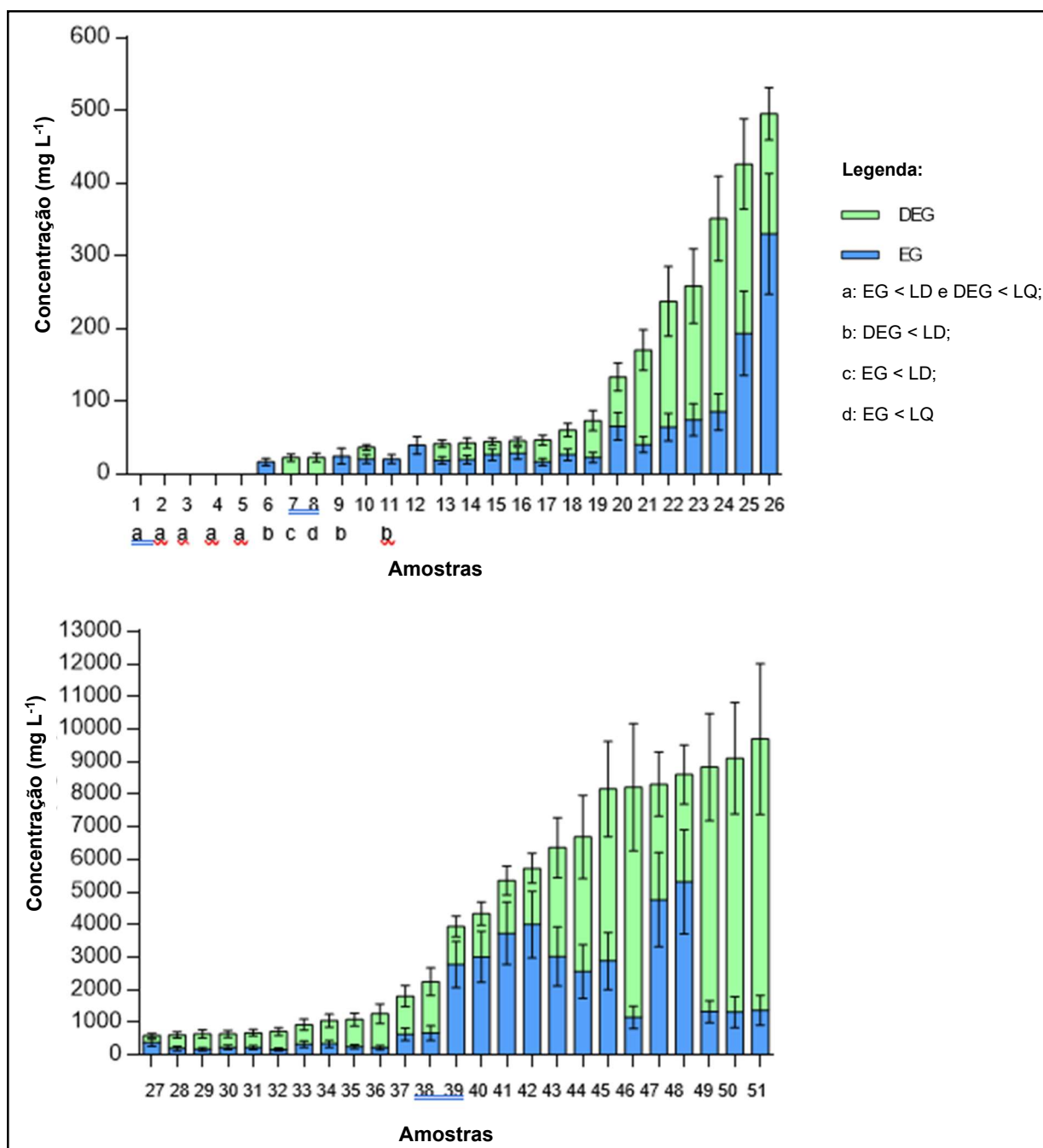
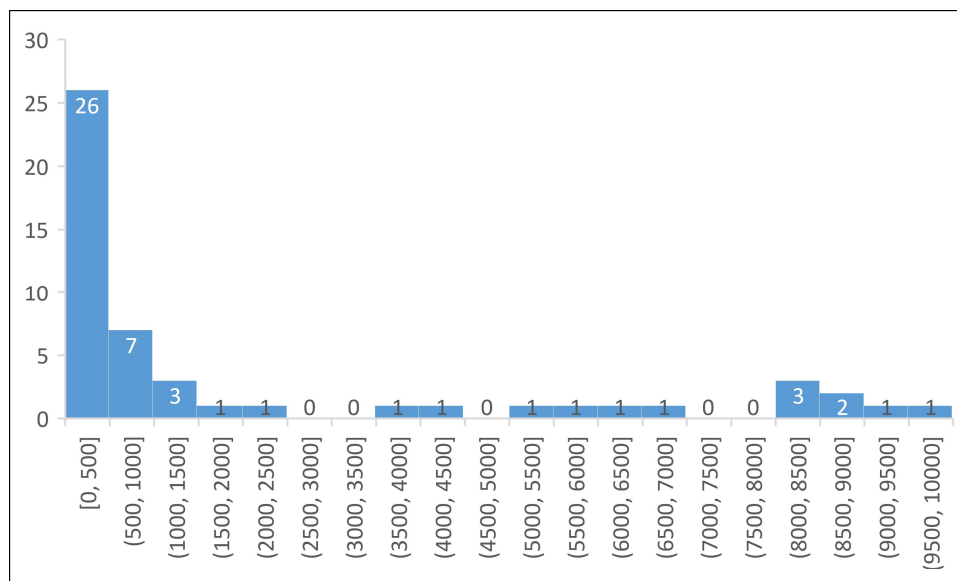


Figura 45 – Histograma das cervejas contaminadas com pelo menos um dos glicóis tóxicos – EG e/ou DEG.



A despeito destes resultados, não é de se esperar que sejam detectados glicóis tóxicos em cervejas comercializadas no Brasil, pois estes resultados decorreram de um episódio pontual. A coleta de amostras não foi representativa do mercado de consumo cervejeiro do Brasil, uma vez que 87% das amostras coletadas referiram-se a apenas um fabricante de cerveja sob investigação, sendo que resultados positivos foram encontrados apenas em cervejas produzidas por este, relacionados a falhas no processo de produção cervejeiro.

Ressalta-se, então, que 93% das amostras analisadas, que inclui 92% das amostras do fabricante sob investigação ($n = 561$) e todas as demais cervejas de outras marcas ($n = 89$), não tiveram EG e DEG detectáveis.

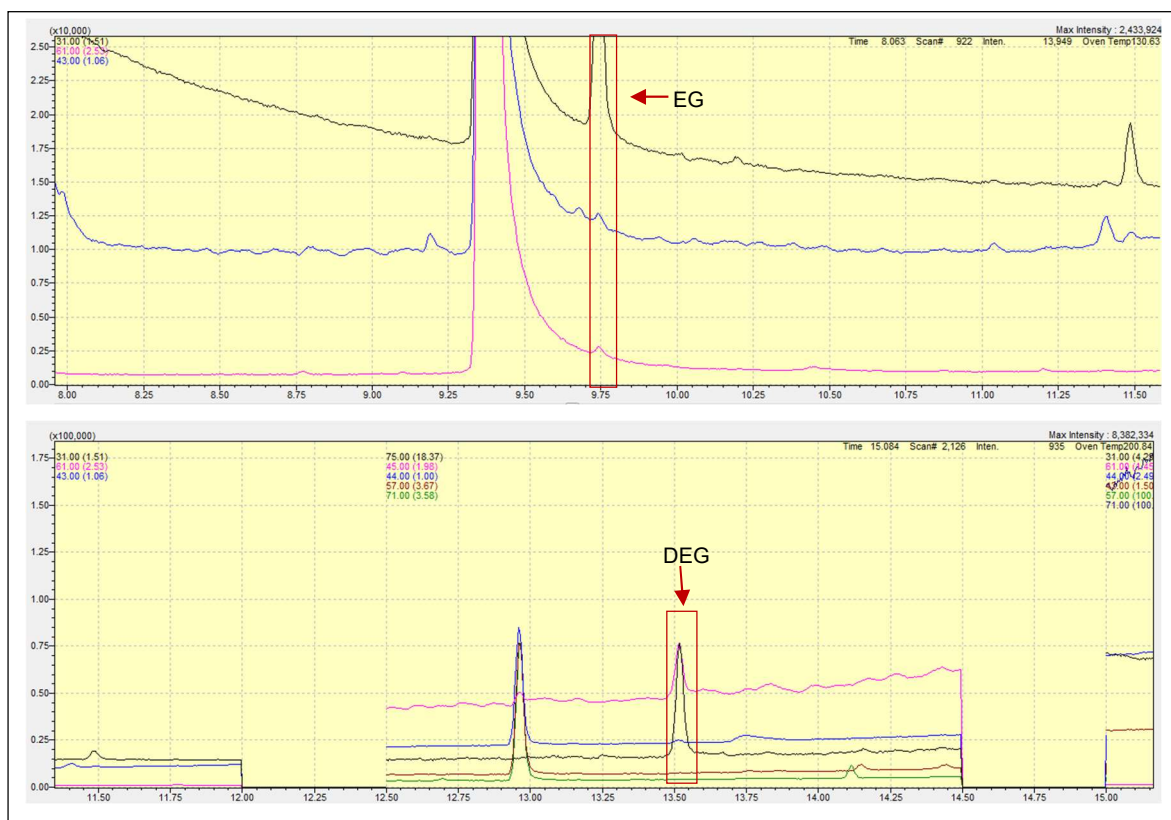
Os resultados das análises permitiram ao MAPA a realização de uma ação fiscal que retirou do mercado mais de 80 mil litros de cerveja contaminada, evitando a exposição da população brasileira a mais riscos que poderiam advir do consumo dessas bebidas (BRASIL, 2020b).

6.5 Análises de amostras de xaropes, soluções, suspensões e emulsões orais

Foram analisadas 36 amostras, compreendendo xaropes farmacêuticos, soluções, suspensões e emulsões orais. Conforme Apêndice B, as amostras apresentaram composições variadas, e, no caso de amostras do mesmo medicamento, lotes diferentes foram avaliados.

Das 20 amostras analisadas, detectou-se EG e DEG em uma amostra (código 4 da Tabela B-1 do Apêndice B) em nível superior ao limite de detecção e inferior ao limite de quantificação do método (Figura 46). Trata-se de uma solução oral que contém GLI e PPG na formulação e que é indicada para uso adulto e pediátrico acima de dois anos.

Figura 46 – Cromatograma (abundância de íons versus tempo) da amostra de xarope contaminado com EG (em cima) e DEG (embaixo), em concentrações superiores ao LD e inferiores ao LQ do método.



A maioria das formas farmacêuticas avaliadas tem indicação de uso para o público infantil, já que formas farmacêuticas líquidas apresentam diversas vantagens para essa faixa etária, como a facilidade de fracionamento de doses, a possibilidade de adição de flavorizantes para mascarar o sabor e a facilidade de deglutição. Desta forma, a possibilidade de presença de álcoois tóxicos nessas formulações é preocupante, já que há maior probabilidade de serem alcançadas suas doses tóxicas no público infantil.

A presença de traço de glicóis identificada em uma amostra analisada evidencia a importância da implantação, nas indústrias farmacêuticas, de métodos analíticos para determinação desses contaminantes nos insumos farmacêuticos (glicerina e propilenoglicol), evitando a contaminação de produtos acabados no Brasil e, conseqüentemente, a possibilidade de eventos de contaminação humana.

7. CONCLUSÕES

Foi possível desenvolver e validar métodos analíticos por GC-MS para a determinação simultânea de contaminantes em diferentes matrizes. Entre estes, foi desenvolvido método analítico para determinação de EG e DEG em cervejas, sendo o primeiro método que possibilita a determinação simultânea desses dois glicóis tóxicos em alimentos. Desenvolveu-se ainda, de forma inédita, método analítico para determinação de EG, DEG e MeOH em glicerina, propilenoglicol e xaropes farmacêuticos.

Os métodos foram validados empregando-se protocolos preconizados pelo Mapa e pela Anvisa e apresentaram resultados satisfatórios para todas as figuras de mérito avaliadas, demonstrando sua aplicação à finalidade analítica.

Além disso, foi desenvolvido um modelo de incerteza dos resultados, de forma a possibilitar conhecer os principais fatores que influenciam o resultado analítico e permitir a expressão destes com a devida qualidade metrológica.

O método para análise de EG e DEG em cervejas apresenta vantagens em relação aos métodos reportados na literatura para determinação de DEG em alimentos, como a inclusão de EG no escopo, o emprego de técnica mais seletiva, a realização de estudos para verificação de efeito matriz e a adoção de um protocolo de validação mais abrangente.

Em relação aos métodos existentes na literatura que determinam concomitantemente EG e DEG em glicerina e propilenoglicol por técnicas diferentes de GC-MS, os métodos analíticos desenvolvidos apresentaram a vantagem de empregar uma faixa de concentração de trabalho mais baixa, o que foi de extrema importância, pois objetivava-se detectar concentrações consideravelmente baixas desses contaminantes. Os métodos apresentaram, assim, baixos limites de detecção e de quantificação. Importante mencionar que a glicerina ou o propilenoglicol foram injetados no sistema em concentração dez vezes inferior às concentrações reportadas na literatura, o que é de extrema importância para maior durabilidade da coluna cromatográfica e maior vida útil dos equipamentos e de seus consumíveis. Além disso, o método desenvolvido

permite a determinação de mais um contaminante, o metanol. Cita-se ainda a vantagem do método apresentar maior seletividade, por empregar a técnica de GC-MS, possibilitando o monitoramento de íons característicos dos analitos com alta confiabilidade.

Por sua vez, o método analítico para a determinação de EG, DEG e MeOH em xaropes por GC-MS foi o primeiro método desenvolvido que identifica os três álcoois tóxicos nessa forma farmacêutica. Este método apresentou menor faixa de trabalho que os métodos descritos na literatura para análise de EG e/ou DEG em produtos acabados, possibilitando a detecção de menores quantidades desses contaminantes.

Além disso, as técnicas de preparo de amostras de todos os métodos desenvolvidos foram simples, por simples diluição das amostras, o que facilita sua aplicação na rotina analítica. Este fato possibilitou o emprego do método analítico para determinação de EG e DEG em cervejas em grande quantidade de amostras, sendo analisadas 701 amostras de cerveja, compreendendo 125 marcas. Apesar dos resultados positivos, o resultado não é representativo do mercado cervejeiro no Brasil, já que a coleta de amostra foi direcionada a principalmente um fabricante alvo de investigação, sendo os resultados positivos atribuídos apenas a este. Desta forma, a presença de glicóis na cerveja foi relacionada a falhas no processo produtivo em um caso isolado de contaminação. O desenvolvimento do método analítico foi essencial para a investigação do caso em questão, fornecendo subsídios para tomada de decisão das organizações envolvidas na inspeção dos alimentos, com objetivo de garantir o fornecimento de produtos seguros para a população. Este foi o primeiro caso de ocorrência relatada de EG e DEG em alimentos comercializados no Brasil.

Por fim, o método analítico para determinação de EG, DEG e MeOH em xaropes foi aplicado na análise de 36 amostras de xaropes farmacêuticos, soluções, suspensões ou emulsões orais, compreendendo diferentes composições a partir de diferentes marcas e/ou lotes de medicamentos. Das 36 amostras analisadas, detectou-se EG e DEG em uma amostra em nível superior ao limite de detecção e inferior ao limite de quantificação do método. A presença de quantidades traço

de glicóis nesta amostra evidencia a importância da adoção de métodos analíticos para determinação desses contaminantes nos insumos farmacêuticos (glicerina e propilenoglicol), evitando a contaminação de produtos acabados no Brasil. Esse controle é crucial para evitar eventos de contaminação humana por álcoois tóxicos, o que é ainda mais crítico quando se leva em consideração que o público que mais consome medicamentos nas formas farmacêuticas avaliadas é o infantil.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, M. H.; POOLE, C. F.; POOLE, S. K. Classification of stationary phase and other materials by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 842, p. 79-114, 1999.
- AHMED, M. K.; MCLEOD, M. P.; NÉZIVAR, J.; GIULIANI, A. W. Fourier transform infrared and near-infrared spectroscopic methods for the detection of toxic diethylene glycol (DEG) contaminant in glycerin based cough syrup. *Spectroscopy*, v. 24, p. 601-608, 2010.
- BAFFI, P.; ELNESER, S.; BAFFI, M.; DEMELIN, M. Quantitative determination of diethylene glycol contamination in pharmaceutical products. *Journal of AOAC International*, v. 83, p. 793-801, 2000.
- BBC. Maiden Pharmaceuticals: Gambia panel says India firm culpable for cough syrup deaths. 2022. Disponível em: <https://www.bbc.com/news/world-asia-india-64047948>. Acesso em: 18 de ago. 2023.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC no. 27, de 17 de Maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, Poder Executivo, de 22 de Maio de 2012. (2012).
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC no. 166, de 24 de Julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, Poder Executivo, de 25 de julho de 2017.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 65, de 10 de dezembro de 2019. Estabelece os padrões de identidade e qualidade para os produtos de cervejaria. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, Poder Executivo, de 11 de dezembro de 2019.
- CABRAL, P. Erros e incertezas nas medições. Porto, 2004. (Apostila).
- CACCAMO, F.; DI COARCIA, A.; SAMPERI, R. Rapid purification with a Carbopack B cartridge and quantitation by gas chromatography. *Journal of Chromatography*, v. 354, p. 478-481, 1986.
- CARVALHO, K. L.; GONÇALVES, G. A. A.; LOPES, A. L.; SANTOS, E. A.; VARGAS, E. A.; MAGALHÃES, W. F. Modelling uncertainty estimation for the determination of aflatoxin M1 in milk by visual and densitometric thin-layer

chromatography with immunoaffinity column clean-up. *Food Additives and Contaminants*, v. 29, p. 679-693, 2012.

CLARY, J. J. Human Toxicity. In CLARY, J. J. *The Toxicology of Methanol*. Hoboken: Wiley, 2013, p. 47-72.

EC - European Commission. Council Directive 2009/6/EC on amending Council Directive 76/768/EEC, concerning cosmetic products, for the purpose of adopting Annexes II and III to technical progress. *Official Journal of the European Communities*, L36, p. 15-17, 2009.

EC. Decisão da Comissão de 14 de agosto de 2002 que implementa a Diretiva do Conselho 96/23/EC relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação dos resultados (2002/657/EC). Atualização em 2021.

EHLERS, A.; MORRIS, C.; KRASOWSKI, M. D. A rapid analysis of plasma/serum ethylene and propylene glycol by headspace gas chromatography. *Springler Plus*, v. 2, 6p., 2013.

EUR. SANTE/2019/12682. *Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed*. 2019.

FARMACOPEIA Brasileira, 6ª edição. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019.

FDA. Lab Method for Gas Chromatography - Mass Spectrometry (GC-MS) Screening Procedure for the Presence of Diethylene Glycol and Ethylene Glycol in Toothpaste, 2007. Disponível em: <<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/lab-method-gas-chromatography-mass-spectrometry-gc-ms-screening-procedure-presence-diethylene-glycol>>. Acesso em: 14 de abr. 2020.

FOWLES, J.; BANTON, M.; KLAPACZ, J.; SHEN, H. A toxicological review of the ethylene glycols series: Commonalities and differences in toxicity and modes of action. *Toxicology Letters*, v. 278, p. 66-83, 2017.

FU, Y; HAO, Z; PARKER, B; KNAPP, M. A Greener Way to Screen Toothpaste for diethylene glycol. *American Journal of Analytical Chemistry*: v. 2, p. 938-943, 2011.

GOLDFRANK, L. R.; FLOMENBAUM, N. E.; LEWIN, N. A.; HOWLAND, M. A.; HOFFMAN, R. S.; NELSON, L. S. *Goldfrank's toxicologic emergencies*. 11 ed. EUA: McGraw-Hill, p.980-990, 2002.

GHOSH, P.; ROY, P. K. Mathematical modelling of methanol poisoning with impulsive dosing of antidote therapeutics to prevent toxicity. *Mathematical Methods in the Applied Sciences*, v. 41, 2018.

HERNÁNDEZ, F.; IBÁÑEZ, M.; SANCHO, J. V. Fast determination of toxic diethylene glycol in toothpaste by ultra-performance liquid chromatography-time of flight mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 391, p. 1021-1027, 2008.

HOLLOWAY, G.; MATHESWARAN, R.; LEEKS, A.; BRADBY, S.; WAHAB, S. Screening method for ethylene glycol and diethylene glycol in glycerin-containing products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 51, p. 507-511, 2010.

ISO GUM (2008), Avaliação de dados de Medição - Guia para a expressão de incerteza de medição, 1ª edição brasileira.

KAISER, R. E.; RIEDER, R. I. Diethylene glycol in wine. *Journal of High resolution Chromatography & Chromatography Communications*, v. 8, p. 863-866, 1985.

KRAUT, J. A.; MULLINS, M. E. Toxic alcohols. *The New England Journal of Medicine*, v. 378; p. 270-280, 2018.

KRONENBERG, J. L. M. Contribuições para o fortalecimento do Laboratório Nacional Brasileiro de Metrologia de Tempo e Frequência. 2007. Dissertação (Mestrado em Metrologia) – Centro Técnico Científico da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

LA CRUZ, M. H. C.; RODRIGUES, J. M.; COUTO, P. R. G.; CUNHA, V. S. Estimativa da incerteza de medição em análise cromatográfica: abordagem sobre a quantificação de carbamato de etila em cachaça. *Química Nova*, v. 33, p. 1578-1584, 2010.

LAU, B. P. Y.; WEBER, D. Determination of diethylene glycol in wines by high-resolution gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 35, p. 412-417, 1987.

LAWRENCE, J. F.; CHADHA, R. K.; LAU, B. P. Y.; WEBER, D.F. Simplified routine method for the determination of diethylene glycol in wines by capillary gas chromatography with flame ionization detection. *Journal of Chromatography*, v. 367, p. 213-216, 1986.

LETH, P. M.; GREGERSEN, M. Ethylene glycol poisoning. *Forensic Science International*, v. 155, p. 179-184, 2005.

LI, X.; ARZHANTSEV, S.; KAUFFMAN, J. F.; SPENCER, J. A. Detection of diethylene glycol adulteration in propylene glycol – Method validation through a multi-instrument collaborative study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 54, p. 1001-1006, 2011.

LÓPEZ-SÁNCHEZ, M.; DOMÍNGUEZ-VIDAL, A.; AYORA-CAÑADA, M. J.; MOLINA-DÍAZ, A. Assesment of dentifrice adulteration with diethylene glycol by means of ATR-FTIR spectroscopy and chemometrics. *Analytica Chimica Acta*, v.620, p. 113-119, 2008.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Manual de garantia da qualidade analítica. Resíduos e Contaminantes*. Brasília: MAPA/ACS, 2011, 227 p.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Manual de garantia da qualidade analítica. Área de Identidade e Qualidade de Alimentos e de Insumos*. Brasília: MAPA/ACS, 2015, 51 p.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Relatório de ações: cervejaria Backer. / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: MAPA, SDA, 2020, 76p. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/mapa-divulga-relatorio-final-das-acoes-na-cervejaria-backer/relatriodeaes_cervejariabacker.pdf. Acesso em: 19 de ago. 2020. 2020.

OIV. Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis. V.1, 2022. Disponível em: <https://www.oiv.int/public/medias/8657/2022-eng-compediumvol2.pdf>. Acesso em: 04 abr 2023.

OKOLIE, J. Insights on production mechanism and industrial applications of renewable propylene glycol. *iScience*, v. 25, 19 p., 2022.

OLIVEIRA, E. C.; AGUIAR, P. F. Comparação de diferentes abordagens para avaliação da incerteza na cromatografia gasosa do gás natural. *Química Nova*, v. 32, p. 1655-1660, 2009.

PAGLIARO, M. Properties, applications, history and market. *In: PAGLIARO, M. Glycerol*. Elsevier, 2017, p. 1-21.

RAHIM, A. A.; SAAD, B.; OSMAN, H.; HASHIM, N.; YAHYA, S.; TALIB, K. M. Simultaneous determination of diethylene glycol, diethylene glycol monoethyl ether, coumarin and caffeine in food items by gas chromatography. *Food Chemistry*, v. 126, p. 1412-1416, 2011.

RESTEK. Nota de aplicação. HILLIARD, C.; ENGLISH, C. Reliable low-level analysis of glycols in water using split injection. 2018 Disponível em: <https://www.google.com.br/search?ei=vVJ6Xt69OLeu5OUPkNGBkAE&q=Reliable+low-level+analysis+of+glycols+in+water+using+split+injection&oq=Reliable+low-level+analysis+of+glycols+in+water+using+split+injection&gs_l=psy-ab.3...5208707.5208707..5209317...0.0..0.378.575.0j1j0j1.....0....2j1..gws->

wiz.uZCJwVf_1pk&ved=0ahUKEwiekKqI4LPoAhU3F7kGHZBoABIQ4dUDCA&uact=5>. Acesso em: 24 de mar. 2020.

SCHEP, L. J.; SLAUGHTER, R. J.; TEMPLE, W. A.; BEASKEY, D. M. G. Diethylene glycol poisoning. *Clinical Toxicology*, v. 47, p. 525-535, 2009.

SELF, R. L. Direct analysis in real time-mass spectrometry (DART-MS) for rapid qualitative screening of toxic glycols in glycerin-containing products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 80, p. 155-158, 2013.

STOECKL, A. Austrian wine: developments after the wine scandal of 1985 and its current situation. *International Wine Business Research Conference*. Montpellier: 2006.

The EUROPEAN Pharmacopoeia Commission. GLYCEROL. European Pharmacopoeia 9th edition, Strasbourg, France: European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare (EDQM), 2019a. p. 6103-6104. Disponível em: <<https://pheur.edqm.eu/>>. Acesso em: 03 de mai. 2020.

The EUROPEAN Pharmacopoeia Commission. ETHYLENE GLYCOL AND DIETHYLENE GLYCOL IN ETHOXYLATED SUBSTANCES. European Pharmacopoeia 9th edition, Strasbourg, France: European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare (EDQM), 2019b. p. 157. Disponível em: <<https://pheur.edqm.eu/>>. Acesso em: 03 de mai. 2020.

The UNITED States Pharmacopoeial Convention. GLYCERIN. United States Pharmacopoeia 42 – National Formulary 37 2nd supplement, Rockville, USA: 2020a. Disponível em: <<https://online.uspnf.com/>>. Acesso em: 03 de mai. 2020.

The UNITED States Pharmacopoeial Convention. PROPYLENE GLYCOL. United States Pharmacopoeia 42 – National Formulary 37 2nd supplement, Rockville, USA: 2020b. Disponível em: <<https://online.uspnf.com/>>. Acesso em: 03 de mai. 2020.

The UNITED States Pharmacopoeial Convention. <1225> VALIDATION OF COMPENDIAL PROCEDURES. United States Pharmacopoeia 42 – National Formulary 37 2nd supplement, Rockville, USA: 2020. Disponível em: <<https://online.uspnf.com/>>. Acesso em: 01 de abr. 2020.

TOKUNAGA, H.; OSAKO, T.; SATO, K. Determination of ethylene glycol and diethylene glycol as the adulterant in concentrated glycerin and propylene glycol. *Journal of Japanese Cosmetic Science Society*, v. 36, p. 265-275, 2012.

TÜRKMEN, N.; EREN, B.; FEDAKAR, R.; AKGÖZ, S.; ÇOMUNOĞLU. Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) and CD34 Expression in the Human Optic Nerve and Brain in Methanol Toxicity. *Adv. Ther.*, v. 25, p. 123-132, 2008.

WHO. Medical Product Alert N°6/2022: Substandard (contaminated) paediatric medicines. Substandard (contaminated) paediatric medicines identified in WHO region of Africa. 2022. Disponível em: [https://www.who.int/news/item/05-10-2022-medical-product-alert-n-6-2022-substandard-\(contaminated\)-paediatric-medicines](https://www.who.int/news/item/05-10-2022-medical-product-alert-n-6-2022-substandard-(contaminated)-paediatric-medicines). Acesso em: 18 de ago. 2023.

XING, X.; SHI, X.; ZHANG, H.; WANG, W.; YE, J. Determination of diethylene glycol in toothpaste by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Microchimica Acta*, v. 167, p. 297-302, 2009.

APÊNDICE A – DADOS DAS CERVEJAS ANALISADAS

Tabela A-1 – Informações das cervejas analisadas.

Código da marca	Nº de amostras	Código do fabricante	Composição
1	159	A	água, malte de cevada, malte de trigo, malte de centeio, lúpulo, aroma e fermento
2	57	A	água, malte de cevada, lúpulo e fermento
3	11	A	água, malte de cevada, lúpulo e levedura cervejeira
4	5	A	água, malte de cevada, malte de trigo, malte de centeio, lúpulo, aroma e fermento
5	13	A	malte de cevada, lúpulo e água
6	15	A	água, malte de cevada, lúpulo, açúcar mascavo e levedura
7	17	A	água, malte de cevada e lúpulo
8	12	A	água, malte de cevada e lúpulo
9	3	A	água, malte de cevada, lúpulo e levedura
10	3	A	água, malte de cevada, lúpulo e açúcar mascavo
11	30	A	água, malte de cevada e lúpulo
12	8	A	água, malte de cevada, lúpulo e levedura
13	4	A	água, malte de cevada, xarope de alta maltose, lúpulo, fermento e aroma natural de chocolate
14	1	A	água, malte de cevada, lúpulo e fermento
15	17	A	água, malte de cevada, lúpulo e fermento
16	78	A	água, malte de cevada, lúpulo e fermento
17	1	A	água, malte de cevada, lúpulo e fermento
18	28	A	água, malte de cevada, malte de trigo, lúpulo, fermento e aromas
19	2	A	(*)
20	1	A	água, malte de cevada, malte de centeio, malte de trigo, lúpulo, aroma e fermento
21	1	A	água, malte de cevada, malte de trigo defumado em carvalho, centeio, lúpulo e fermento
22	1	A	(*)
23	2	A	água, malte de cevada, açúcar de cana, lúpulo e fermento
24	2	A	água, malte, lúpulo e levedura
25	1	A	Não informado
26	18	A	água, malte de cevada, lúpulo, levedura e limão capeta
27	10	A	água, malte de cevada, malte de trigo, farinha de trigo, glócos de aveia, lúpulo, extrato de capim limão e fermento
28	2	A	água, malte de cevada, lúpulo e levedura
29	1	A	água, malte de cevada, lúpulo, levedura, sal rosa do Himalaia, semente de coentro e flores de hibisco
30	1	A	água, malte de cevada, malte de trigo, lúpulo, flocos de aveia e fermento

Tabela A-1 – Informações das cervejas analisadas (continuação).

Código da marca	Nº de amostras	Código do fabricante	Composição
31	18	A	água, malte de cevada, malte de trigo, lúpulo, suco de amora, suco de morango, suco de framboesa vermelha, açúcar mascavo e fermento
32	1	A	água, malte de cevada, lúpulo e levedura de alta fermentação
33	1	A	água, malte de cevada, lúpulo e levedura cervejeira
34	4	A	água, malte de cevada, lúpulo e fermento
35	7	A	água, malte de cevada, lúpulo e levedura cervejeira
36	21	A	água, malte de cevada, lúpulo e fermento
37	23	A	água, malte de cevada, lúpulo, extrato de casca de laranja, suco de maracujá e fermento
38	31	A	água, malte de cevada, lúpulo e levedura
39	6	A	água, malte de cevada, lúpulo e levedura
40	1	A	água, malte de cevada, malte de trigo, lúpulo, suco de morango, suco de framboesa, suco de amora, flocos de aveia e levedura
41	1	A	água, malte de trigo, lúpulo, levedura e capim limão
42	1	A	(*)
43	1	B	água, malte de cevada, lúpulo, estabilizante e antioxidante
44	1	C	(*)
45	1	D	(*)
46	1	E	água, malte de cevada, malte, lúpulo e levedura
47	1	F	água, malte de cevada, lúpulo e leveduras
48	1	F	água, malte de cevada, lúpulo e leveduras
49	1	F	água, malte de cevada, lúpulo e leveduras
50	1	G	água, malte de cevada, lúpulo e leveduras
51	1	H	água, malte e lúpulo
52	1	I	água, malte de cevada, lúpulo e antioxidante 316
53	1	I	água, malte de cevada, lúpulo e leveduras
54	1	J	água, malte de cevada, lúpulo e leveduras
55	1	J	água, maltes, lúpulos, antioxidante INS 316
56	1	K	água, malte de cevada, fermento, lúpulo e água
57	1	K	água, malte de cevada, fermento, lúpulo e água
58	1	L	malte de cevada, lúpulo e água
59	1	L	água, malte de cevada e lúpulo
60	1	M	água, malte de cevada, malte de trigo, lúpulo e levedura cervejeira
61	1	M	água, malte de trigo, lúpulo, gengibre e levedura cervejeira
62	1	N	água, malte de cevada e lúpulo
63	1	O	água, malte de cevada e lúpulo

Tabela A-1 – Informações das cervejas analisadas (continuação).

Código da marca	Nº de amostras	Código do fabricante	Composição
64	1	O	água, malte de cevada, milho e lúpulo
65	1	P	água, malte de cevada, lúpulo, levedura e antioxidante INS 316
66	1	Q	(*)
67	2	R	(*)
68	1	S	água, malte de cevada, lúpulo e levedura
69	1	T	água, malte de cevada, lúpulo, levedura
70	1	T	água, malte de cevada, lúpulo, levedura e framboesa
71	1	T	água, malte de cevada, lúpulo, levedura
72	1	U	água, malte de cevada, lúpulo, levedura
73	1	V	água, malte de cevada, lúpulo e levedura
74	1	V	água, malte de cevada, lúpulo e levedura
75	1	W	água, malte de cevada, milho, lúpulo, antioxidantes INS 300/316, acidulantes INS 270/338, estabilizante INS 405 e gás carbônico natural
76	1	X	água, malte de cevada, lúpulo, levedura
77	1	Y	água, malte de cevada, rapadura, lúpulo e fermento
78	1	Y	água, malte de cevada, lúpulo e extrato de casca de laranja
79	1	O	água, malte de cevada, arroz e lúpulo
80	1	M	água, malte de cevada, lúpulo e levedura cervejeira
81	1	Z	água, malte de cevada, lúpulo e levedura
82	1	H	água, lúpulo, malte e levedura
83	1	AA	água, malte de cevada, milho, lúpulo e antioxidante ácido ascórbico INS 300
84	1	H	água, malte de cevada e lúpulo
85	1	BB	água, malte de cevada, malte de trigo, lúpulo e levedura
86	3	CC	água, malte de cevada e lúpulo
87	1	DD	água, malte de cevada, carboidratos e lúpulo
88	1	DD	água, malte de cevada, lúpulo e levedura
89	1	DD	água, malte de cevada, trigo, lúpulo e levedura
90	1	EE	(*)
91	1	H	água, cevada e lúpulo
92	1	FF	água, malte de cevada, trigo, açúcar de beterraba, levedura, lúpulo, semente de coentro, casca de laranja e acidulante ácido cítrico.
93	1	GG	água, malte de cevada, lúpulo, antioxidantes INS 316 e INS 223
94	1	HH	água, malte de cevada orgânico, malte de trigo torrado orgânico, fermento US-05 e lúpulo
95	1	S	água, malte de cevada, milho e lúpulo
96	1	II	água, malte de cevada, lúpulo e leveduras

Tabela A-1 – Informações das cervejas analisadas (continuação).

Código da marca	Nº de amostras	Código do fabricante	Composição
97	1	G	água, malte de cevada, lúpulo e levedura
98	1	H	água, malte de cevada, malte de trigo e lúpulo
99	1	JJ	água, malte de cevada, lúpulo e levedura
100	1	O	água, malte de cevada, milho, cevada, açúcar e lúpulo
101	1	KK	água, malte de cevada, lúpulo e levedura
102	1	LL	água, malte de cevada, lúpulo e levedura
103	1	LL	água, malte de cevada, lúpulo e levedura
104	1	JJ	água, malte de cevada, lúpulo e levedura
105	1	O	água, malte de cevada, milho e lúpulo
106	1	MM	água, malte de trigo, malte de cevada e lúpulo. Contém antioxidantes (INS 316/INS 223) e estabilizante (INS 405)
107	1	GG	água, malte de cevada e lúpulo
108	1	NN	água, malte de trigo, malte de cevada, levedura, lúpulo, limão siciliano e coentro
109	1	OO	água, malte de cevada, lúpulo e levedura
110	2	OO	água, malte de cevada, lúpulo e levedura
111	1	PP	água, malte de cevada, maltes especiais, lúpulo e levedura
112	1	M	água, malte de cevada, lúpulo e levedura
113	1	M	água, malte de cevada, lúpulo e levedura
114	1	QQ	(*)
115	1	RR	água, malte de cevada, flocos de aveia, lúpulo e levedura
116	1	O	água, malte de cevada, milho e lúpulo
117	3	SS	água, malte de cevada, lúpulo e levedura
118	1	O	água, lúpulo, malte de cevada e milho
119	1	JJ	água, malte de cevada, lúpulo, aveia e levedura
120	1	TT	água, malte de cevada, lúpulo e levedura
121	1	UU	água, malte de cevada, trigo, aveia, especiarias e lúpulo
122	1	UU	água, malte de cevada e lúpulo
123	1	VV	água, malte de cevada e lúpulo
124	1	RR	água, malte de cevada, lúpulo e levedura
125	1	WW	água, malte de cevada, lúpulo e levedura

Legenda: (*) Não foi possível recuperar a composição de ingredientes destas cervejas.

APÊNDICE B – DADOS DAS PREPARAÇÕES FARMACÊUTICAS ANALISADAS

Tabela B-1 – Informações das amostras de xaropes, soluções, suspensões e emulsões orais analisadas.

Código da amostra	Forma farmacêutica	Princípio ativo	Excipientes	Faixa etária indicada
1	Xarope	maleato de dexclorfeniramina 2 mg/5 mL + cloridrato de fenilefrina 5 mg / 5 mL	sorbitol, glicerol, álcool etílico, metilparabeno, propilparabeno, ácido cítrico monohidratado, citrato de sódio di-hidratado, sacarose, corante amarelo FDC nº 5, corante vermelho FDC nº 40, aroma artificial de framboesa, aroma artificial de tutti-frutti e água purificada	uso adulto e pediátrico acima de 2 anos
2	Solução oral	maleato de dexclorfeniramina 0,4 mg/mL	propilenoglicol, solução de sorbitol, metilparabeno, propilparabeno, álcool etílico, mentol, sacarose, cloreto de sódio, citrato de sódio di-hidratado, aroma artificial de damasco, aroma artificial de laranja e água purificada	uso adulto e pediátrico acima de 2 anos
3	Xarope	cloridrato de ambroxol 6 mg/mL	ácido tartárico, sacarina sódica, sorbitol, glicerol, essência de framboesa, essência de baunilha, benzoato de sódio, propilenoglicol, hietelose, metilparabeno, propilparabeno e água purificada	uso adulto e pediátrico acima de 2 anos
4	Solução oral	paracetamol 40 mg + cloridrato de fenilefrina 1 mg + maleato de carboxinamida 0,4 mg	macrogol, metilparabeno, propilparabeno, propilenoglicol, glicerol, sacarina sódica, ciclamato de sódio, glicose, corante vermelho 40, aroma de cereja, ácido láctico e água purificada	uso adulto e pediátrico acima de 2 anos
5	Xarope	maleato de dexclorfeniramina 2 mg/5 mL + betametasona 0,25 mg/5 mL	sacarose, ácido cítrico, benzoato de sódio, sorbitol, propilenoglicol, cloreto de sódio, aroma de groselha e água purificada	uso adulto e pediátrico acima de 2 anos
6	Xarope	maleato de dexclorfeniramina 2 mg/5 mL + betametasona 0,25 mg/5 mL	sacarose, ácido cítrico, benzoato de sódio, sorbitol, propilenoglicol, cloreto de sódio, aroma de groselha e água purificada	uso adulto e pediátrico acima de 2 anos
7	Xarope	maleato de dexclorfeniramina 2 mg/5 mL + cloridrato de fenilefrina 5 mg / 5 mL	sorbitol, glicerol, álcool etílico, metilparabeno, propilparabeno, ácido cítrico monohidratado, citrato de sódio di-hidratado, sacarose, corante amarelo FDC nº 5, corante vermelho FDC nº 40, aroma artificial de framboesa, aroma artificial de tutti-frutti e água purificada.	uso adulto e pediátrico acima de 2 anos
8	Xarope	acetilcisteína 20 mg/mL	hietelose, sacarina sódica, ciclamato de sódio, propilparabeno, metilparabeno, hidróxido de sódio, essência de framboesa, edetato dissódico dihidratado, propilenoglicol e água purificada	uso pediátrico acima de 2 anos
9	Solução oral	<i>Pelagonium sidoides</i> 825 mg/mL	glicerol	uso adulto e pediátrico acima de 1 ano

Tabela B-1 – Informações das amostras de xaropes, soluções, suspensões e emulsões orais analisadas (continuação).

Código da amostra	Forma farmacêutica	Princípio ativo	Excipientes	Faixa etária indicada
10	Suspensão oral	cloridrato de fexofenadina 6 mg/mL	propilenoglicol, edetato dissódico di-hidratado, goma xantana, poloxâmer, dióxido de titânio, fosfato de sódio monobásico monohidratado, fosfato de sódio dibásico heptaidratado, creme flavorizante de framboesa, sacarose, xilitol e água purificada	uso pediátrico a partir de 6 meses (a depender da indicação)
11	Xarope	loratadina 1 mg/mL	ácido cítrico, ciclamato de sódio, glicerol, metilparabeno, propilparabeno, propilenoglicol, sacarina sódica, sorbitol e água purificada	uso adulto e pediátrico acima de 2 anos
12	Xarope	guaifenesina 200 mg/15 mL	ácido cítrico, sacarose, álcool etílico, benzoato de sódio, carmelose sódica, citrato de sódio, polioxil40 estearato, levomentol, óxido de polietileno, propilenoglicol, sacarina sódica, vermelho FD&C 40 e água purificada	uso adulto e pediátrico acima de 2 anos
13	Xarope	guaifenesina 200 mg/15 mL	açúcar hidrolisado, propilenoglicol, citrato de sódio, carboximetilcelulose de sódio, ácido cítrico anidro, benzoato de sódio, óxido de polietileno N.F., polisorbato 60, sweetung 4601 (aspartame e acessulfamo K), mel, sistema flavorizante sabor mel, mentol e eucalipto, água purificada	uso adulto e pediátrico acima de 2 anos
14	Suspensão oral	paracetamol 100 mg/mL	glicerol, sorbitol, propilenoglicol, propilparabeno, goma xantana, sacarina sódica, ciclamato de sódio, benzoato de sódio, carmelose sódica, celulose microcristalina, ácido cítrico, vermelho allura 129 laca de alumínio, essência de cereja, sucralose e água purificada.	uso pediátrico
15	Xarope	cloridrato de ambroxol 15 mg/5 mL	ácido cítrico, aroma de mel, benzoato de sódio, glicerol, propilenoglicol, sacarina sódica, ciclamato de sódio, sorbitol, hietelose, corante caramelo C e água purificada.	uso pediátrico
16	Xarope	desloratadina 0,5 mg/mL	sorbitol, glicerol, edetato dissódico di-hidratado, metilparabeno, propilparabeno, sacarina sódica, ciclamato de sódio, hietelose, essência de damasco, ácido cítrico e água purificada	uso adulto e pediátrico
17	Xarope	acebrofilina 25 mg/5 mL	metilparabeno, propilparabeno, sucralose, glicerol, sorbitol, ácido cítrico, citrato de sódio di-hidratado, aroma de groselha e água purificada.	uso pediátrico acima de 2 anos
18	Xarope	cloridrato de ambroxol 30 mg/5 mL	aroma de abacaxi, glicerol, sorbitol, hietelose, ácido benzóico, acessulfamo e água purificada	uso adulto
19	Xarope	acetilcisteína 20 mg/mL	carmelose, edetato dissódico, benzoato de sódio, sacarina sódica, ciclamato de sódio, metilparabeno, propilparabeno, sorbitol, glicerol, hidróxido de sódio, essência de framboesa líquida hidrossolúvel, álcool etílico e água purificada	uso pediátrico acima de 2 anos

Tabela B-1 – Informações das amostras de xaropes, soluções, suspensões e emulsões orais analisadas (continuação).

Código da amostra	Forma farmacêutica	Princípio ativo	Excipientes	Faixa etária indicada
20	Xarope	maleato de dexclorfeniramina 2 mg/5 mL	sacarina sódica, sorbitol, aromas de laranja e damasco, álcool etílico, propilenoglicol, metilparabeno, propilparabeno, cloreto de sódio, citrato de sódio, mentol, ciclamato de sódio e água purificada	uso adulto e pediátrico acima de 2 anos
21	Solução oral	desloratadina 0,5 mg/mL	ácido cítrico, aroma de morango, benzoato de sódio, citrato de sódio di-hidratado, edetato dissódico, glicerol, hietelose, sorbitol, sucralose e água purificada	uso adulto e pediátrico acima de 6 meses
22	Suspensão oral	paracetamol 100 mg/mL	glicerol, sorbitol, propilenoglicol, propilparabeno, goma xantana, sacarina sódica, ciclamato de sódio, benzoato de sódio, carmelose sódica, celulose microcristalina, ácido cítrico, vermelho allura 129 laca de alumínio, essência de cereja, sucralose e água purificada.	uso pediátrico
23	Xarope	0,5 mg/mL	sorbitol, glicerol, edetato dissódico di-hidratado, metilparabeno, propilparabeno, sacarina sódica, ciclamato de sódio, hietelose, essência de damasco, ácido cítrico e água purificada	uso adulto e pediátrico acima de 6 meses
24	Suspensão oral	100 mg/mL	goma xantana, glicerol, benzoato de sódio, ácido cítrico, propilenoglicol, aroma artificial de frutas roxas, sorbitol, sacarina sódica, ciclamato de sódio, dióxido de titânio, sucralose e água purificada	uso pediátrico acima de 6 meses
25	Solução oral	desloratadina 0,5 mg/mL	ácido cítrico, aroma de morango, benzoato de sódio, citrato de sódio di-hidratado, edetato dissódico, glicerol, hietelose, sorbitol, sucralose e água purificada	uso adulto e pediátrico acima de 6 meses
26	Solução oral	simeticona 75 mg/mL	propilenoglicol, goma xantana, metilparabeno, propilparabeno, ciclamato de sódio, sacarina sódica, essência de cereja, ácido cítrico, citrato de sódio, povidona, glicerol, sorbitol e água purificada	uso pediátrico
27	Solução oral	rifamicina 10 mg/mL	propilenoglicol, ácido ascórbico, metabissulfito de potássio, edetato dissódico di-hidratado, hidróxido de sódio e água purificada	uso adulto e pediátrico
28	Solução oral	ácido ascórbico 200 mg/mL	glicerol, hidróxido de sódio, propilenoglicol, para-hidroxibenzoato de metila, sorbato de potássio, aroma natural de laranja, sacarina sódica, caramelo IV, EDTA dissódico e água purificada	uso adulto e pediátrico acima de 6 meses
29	Xarope	cloridrato de ambroxol 15 mg/5 mL	ácido cítrico, aroma de mel, benzoato de sódio, glicerol, propilenoglicol, sacarina sódica, ciclamato de sódio, sorbitol, hietelose, corante caramelo C e água purificada.	uso pediátrico

Tabela B-1 – Informações das amostras de xaropes, soluções, suspensões e emulsões orais analisadas (continuação).

Código da amostra	Forma farmacêutica	Princípio ativo	Excipientes	Faixa etária indicada
30	Solução oral	cloridrato de benzidamina 1,5 mg/mL	álcool etílico, glicerol, metilparabeno, propilparabeno, sacarina sódica, ciclamato de sódio, sorbitol, corante amarelo de tartrazina, corante azul indigotina, mentol cristal, água purificada e óleo de rícino polietoxilado.	uso adulto e pediátrico acima de 6 anos
31	Solução oral	simeticona 75 mg/mL	metilparabeno, propilparabeno, sacarina sódica, ciclamato de sódio, propilenoglicol, goma xantana, óleo de rícino hidrogenado, aroma de cereja, celulose microcristalina, carmelose, corante vermelho n° 40 e água purificada.	uso adulto e pediátrico
32	Solução oral	ibuprofeno 100 mg/mL	goma xantana, glicerol, benzoato de sódio, ácido cítrico, propilenoglicol, sorbitol, sacarina sódica, ciclamato de sódio, dióxido de titânio, sucralose, polissorbato 80, aroma de morango, aroma de tutti-frutti e água purificada	uso adulto e pediátrico acima de 6 meses
33	Emulsão oral	simeticona 75 mg/mL	carmelose sódica, goma, xantana, metilparabeno, propilparabeno, sacarina sódica, ciclamato de sódio, óleo de rícino etoxilado 35OE, corante vermelho 40, aroma de cereja, propilenoglicol e água purificada	uso adulto e pediátrico
34	Xarope	lote placebo	composição não informada, contém propilenoglicol	não informado
35	Xarope	lote placebo	composição não informada, contém propilenoglicol	não informado
36	Xarope	lote piloto	composição não informada, contém propilenoglicol	não informado

APÊNDICE C – Artigo publicado no periódico Food Chemistry

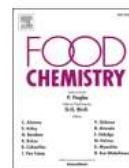
Food Chemistry 346 (2021) 128871



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem



Simultaneous quantification of ethylene glycol and diethylene glycol in beer by gas chromatography coupled to mass spectrometry

Leila Rodrigues Caldeira^{a,b}, Fernando Diniz Madureira^b, Thalita De Faria Maia^b, Carlos Vitor Muller^c, Christian Fernandes^{a,*}

^a Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil

^b Laboratório Federal de Defesa Agropecuária, Avenida Raja Gabaglia, 245, Setor H, Bairro Cidade Jardim, Belo Horizonte, MG 30380-103, Brazil

^c Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Esplanada dos Ministérios, Bloco D, Brasília, Distrito Federal 70043-900, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Glycols
Beverage
Food contaminants
Gas chromatography
Mass spectrometry

Chemical compounds studied in this article:

Ethylene glycol (PubChem CID: 174)
Diethylene glycol (PubChem CID: 8117)

ABSTRACT

An analytical method for the simultaneous determination of ethylene glycol and diethylene glycol in beer was developed and validated according to current legislation. This method includes the application of sample dilution with ethanol followed by quantification using gas chromatography coupled to mass spectrometry. All figures of merit were within the limits established by regulation. The recoveries of the analytes, expressed as mean recovery, were between 91.9% and 108.9%. Precision, in terms of repeatability and intermediate precision, was established (relative standard deviations were lower than or equal to 10%). The limits of detection (10.0 and 5.0 mg.L⁻¹ for ethylene glycol and diethylene glycol, respectively) and quantification (15.0 mg.L⁻¹ for ethylene glycol and diethylene glycol) obtained were appropriate. Finally, the present method was applied for determination of ethylene glycol and diethylene glycol in 701 beer samples (from 67 different brands and 128 different labels), proving to be reliable.

1. Introduction

Ethylene glycol (EG) and diethylene glycol (DEG) (Fig. 1) are clear, hygroscopic, odorless and sweet tasting liquids. These glycols are miscible with water and polar organic solvents. They are mainly used as humectant, solvent, antifreeze and coolants agents in the production of automotive antifreeze and coolant formulations, aircraft anti-icing and deicing materials (Fowles, Banton, Klapacz, & Shen, 2017).

EG and DEG have physicochemical properties similar to non-toxic and more expensive glycols, such as glycerol (GRO) and propylene glycol (PPG) (Fig. 1). As a result, they are often used as adulterants in products based on GRO or PPG, mainly in pharmaceutical products such as toothpaste, injectable drugs, antipyretic medication and cough syrup (Marraffa, Holland, Stork, Hoy, & Hodgman, 2007).

Unlike PPG and GRO, which are both generally recognized as safe in food, cosmetics and drugs, there are no approved use for EG and DEG in these products because of their high toxicities. In fact, there are several reports of incidents involving human poisoning, mainly caused by DEG.

The determination of DEG or both EG and DEG in pharmaceutical products by gas chromatography coupled to mass spectrometry

(GC-MS) (FDA, 2007; Fu, Hao, Parker, & Knapp, 2011), gas chromatography with flame ionization detection (GC-FID) (Holloway, Matheswaran, Leeks, Bradby, & Wahab, 2010), ultra-high performance liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry (UHPLC-HRMS) (Hernández, Ibáñez, & Sancho, 2008), attenuated total reflection Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy (López-Sánchez, Domínguez-Vidal, Ayora-Cañada, & Molina-Díaz, 2008); direct analysis in real time-mass spectrometry (DART-MS) (Self, 2013) and excipients by GC-FID (Tokunaga, Osako, & Sato, 2012) have been reported.

As previously described, several analytical techniques are described in the literature for the analysis of toxic glycols in different matrices, and, due to the physical-chemical characteristics of this group of compounds, GC-MS is a highly recommended technique for its analysis.

Published analytical methods for analysis of DEG in food are more limited. There are few studies from the 1980s regarding the analysis of DEG in wine (Caccamo, Di Coarcia, & Samperi, 1986; Kaiser & Rieder, 1985; Lau & Weber, 1987; Lawrence, Chadha, Lau, & Weber, 1986) because, in that time, some events related to the addition of DEG in this beverage occurred. This practice was done to improve its sweet taste.

* Corresponding author at: Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Pres. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil.
E-mail address: cfernandes@farmacia.ufmg.br (C. Fernandes).

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128871>

Received 19 August 2020; Received in revised form 4 December 2020; Accepted 9 December 2020

Available online 15 December 2020

0308-8146/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

APÊNDICE D – Trabalho apresentado no V Simpósio Nacional em Ciências Farmacêuticas



CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado **DETERMINAÇÃO DE ÁLCOOIS TÓXICOS EM GLICERINA, PROPILENOGLICOL, XAROPES FARMACÊUTICOS E CERVEJAS** dos autores **Leila Rodrigues Caldeira, Christian Fernandes e Ricardo Mathias Orlando** foi apresentado na modalidade **Apresentação Oral** na área temática de **Análises e Controle de Qualidade**, durante o evento **V Simpósio Nacional em Ciências Farmacêuticas (V SINCIFAR)** realizado nos dias 23, 24 e 25 de agosto de 2023, na cidade de Belo Horizonte – MG.

Belo Horizonte, 25 de agosto de 2023.

Isabela da Costa César

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Faculdade de Farmácia – UFMG

Gabriel Corrêa Veríssimo

Membro da Comissão Organizadora
V SINCIFAR

