

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Vanessa Moreira Osório

**Desenvolvimento de método para análise
de acroleína-DNPH em alimento, ar expirado e
ar ambiente utilizando SPME-GC/MS.**

**Belo Horizonte - MG
2012**

UFMG/ICEX/DQ 907

T. 399

Vanessa Moreira Osório

Desenvolvimento de método para análise de acroleína-DNPH em alimento, ar expirado e ar ambiente utilizando SPME-GC/MS.

Tese apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Química em Ciências-Química

Belo Horizonte - MG

2012

Osório, Vanessa Moreira
0837d Desenvolvimento de método para análise de
2012 acroleína-DNPH em alimento, ar expirado e ar ambiente
T utilizando SPME-GC/MS / Vanessa Moreira Osório. 2012.
xv, 95 f. : il.

Orientadora: Zenilda de Lourdes Cardeal.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Química.

Bibliografia: f. 88-95.

1. Química analítica - Teses 2. Cromatografia de gás - Teses 3. Acroleína - Teses 4. Alimentos - Análise - Teses I. Cardeal, Zenilda de Lourdes, Orientadora II. Título.

CDU 043



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEx
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG
TEL.: 031 - 3409-5732
FAX: 031 - 3409-5711
E-MAIL: pgquimic@qui.ufmg.br



**"Desenvolvimento de Método para Análise de acroleína-DNPH em Alimento, Ar
Expirado e Ar Ambiente Utilizando SPME-GC/MS"**

Vanessa Moreira Osório

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Profa. Zenilda de Lourdes Cardeal - Orientadora
UFMG

Prof. Jailson Bittencourt de Andrade
UFBA

Prof. Antônio Augusto Neves
UFV

Profa. Leiliane Coelho André Amorim
UFMG/Farmácia

Profa. Isabel Cristina Pereira Fortes
UFMG

Belo Horizonte, 21 de maio de 2012.

Contudo, seja qual for o grau a
que chegamos, o que importa é
prosseguir decididamente.

(Filipenses 3,16)

***Aos meus pais pelo amor,
carinho e paciência.***

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser o meu sustento, meu tudo.

À professora Zenilda Cardeal pela orientação e incentivo.

Aos meus pais Margarida e José Geraldo por acreditarem e me darem todo o apoio e carinho. Aos meus irmãos Júnior e Vivian, a minha sobrinha Luisa e meu cunhado Marcelo que ao longo desta longa jornada, sempre se fizeram presentes.

Aos meus companheiros de laboratório 171 e 167, Amauri, Breno, Cláudia, Helvécio, Isabela, Jaqueline, Júlio, Junia, Karla, Marcos, Maria José, Michely e Miriany. Obrigado pela amizade e pela troca de experiência.

Aos meus grandes amigos a qual não caberia citá-los todos aqui que mesmo distante me ajudaram com sua paciência e preocupação.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Vagner pela disponibilidade e cooperação junto ao CETEC.

RESUMO

Os compostos carbonílicos (CC) são compostos altamente tóxicos. A exposição humana aos CC ocorre a partir da inalação de seus vapores, contato com a pele e ingestão através dos alimentos. Portanto, o conhecimento dos níveis de concentração dos compostos carbonílicos é de extrema importância para avaliações ambientais de contaminação e exposição, porém limita-se na maioria das vezes, apenas a concentração de formaldeído e, algumas vezes, de acetaldeído, deixando de lado outros poluentes não menos nocivos à saúde humana.

Uma crescente preocupação tem sido em relação à exposição da população que passa a maior parte do dia em recintos fechados como, por exemplo, casas, escritórios, lojas e ambientes de lazer aos compostos carbonílicos. A exposição nestes ambientes torna-se mais crítica devido ao maior tempo de exposição e às elevadas concentrações de poluentes emitidas por diversas fontes.

Neste trabalho, foi desenvolvido e validado um método de cromatografia gasosa para determinação de acroleína, um composto carbonílico tóxico, em amostras de ar expirado, ar ambiente e em alimentos fritos com diferentes tipos de óleo. Para a análise do ar expirado a curva analítica foi construída com um sistema de geração de padrão gasoso de acroleína através de um método de permeação. As análises foram efetuadas por cromatografia gasosa com detector de espectrometria de massas utilizando a técnica de microextração em fase sólida (SPME) com fibra de poliacrilato (PA).

Foram desenvolvidos dois métodos de derivatização com 2,4-dinitrodenilhidrazina (2,4-DNPH) para a quantificação de acroleína por SPME-GC/MS, para a análise de alimentos a derivatização foi feita na solução de 2,4-DNPH e para as análises do ar expirado e do ar ambiente a derivatização foi feita na fibra de PA.

As metodologias desenvolvidas foram validadas e aplicadas em amostras reais de ar expirado de dois grupos de indivíduos, fumantes e não fumantes. Os resultados obtidos apresentaram diferença estatisticamente significativa para os

grupos de indivíduos fumantes e não fumantes. Em média a concentração de acroleína no ar expirado de indivíduos não fumantes foi menor quando comparada à dos indivíduos fumantes. No ar ambiente a concentração de acroleína foi maior nos estacionamentos devido à emissão de acroleína pela queima de combustíveis.

A metodologia desenvolvida permitiu uma análise quantitativa de acroleína-DNPH em vários alimentos (batata, mandioca e lingüiça) fritos em diferentes tipos de óleos. Os valores encontrados neste estudo foram menores que o limite máximo estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) - 2002, que especifica que a concentração de acroleína em alimentos não ultrapasse 40 µg/g. A concentração de acroleína foi menor em batata frita em óleo de soja, devido o menor teor de ácidos graxos insaturados presente neste óleo. Em mandioca e lingüiça a concentração de acroleína utilizando óleo de milho apresentou valores próximos indicando que a absorção do óleo independe do tipo de alimento.

O método de microextração em fase sólida utilizado para amostragem e extração de acroleína nas diferentes matrizes mostrou-se adequada, considerando a simplicidade e rapidez no processo de análise. A cromatografia gasosa com espectrometria de massas proporcionou a seletividade, precisão, sensibilidade e confiabilidade exigidas para os estudos. Todos os resultados encontrados para estes parâmetros mostraram-se adequados para o propósito de estudo.

Palavras Chaves: Acroleína, alimentos fritos, cromatografia gasosa, ar expirado, ar ambiente.

ABSTRACT

The carbonyl compounds (CC) are highly toxic compounds. Human exposure to CC occurs from vapors inhalation, dermal absorption and through food ingestion. Therefore, knowledge of the concentration levels of carbonyl compounds is extremely important for the evaluation of environmental contamination and exposure nevertheless in most cases, it is limited to the concentration of formaldehyde and, sometimes, acetaldehyde, neglecting other pollutants no less harmful to human health.

A growing concern has been focused to the population that spends most of the day indoors, for instance, houses, offices, shops and leisure environments. Exposure to these environments becomes more critical due to the longer exposure time and high concentrations of pollutants emitted from various sources.

This study describes the development and validation of gas chromatography methods for determination of acrolein in samples of exhaled air, ambient air and foods fried with different types of oil. For the analysis of exhaled air analytical curve was built with a standard gas generation system through a permeation method. The analyses were carried out by gas chromatography with mass spectrometry detector using the technique of solid phase microextraction (SPME) with polyacrylate fiber (PA). To analyze the breath acrolein has been used a method permeation a system for generating pattern gaseous acrolein to construct the calibration curve. The samples were analyzed by gas chromatography with mass spectrometry detector using the technique of solid phase microextraction (SPME).

Two derivatization methods with 2,4-DNPH were developed, one using derivation in solution, for food analyses and another using derivation on PA fiber the analyses of breath and ambient air.

The developed methods were validated and applied to real samples of exhaled air from two groups of individuals, smokers and non-smokers. The results showed no statistically significant difference for the groups of smokers and non-smokers. Average concentration of acrolein in exhaled air of non-smokers was

lower when compared to that of smokers. In ambient air, the concentrations of acrolein were greater in parking lots due to emission of acrolein by burning fuels.

The methodology developed allowed quantitative analyses of acrolein-DNPH; in various foods (potatoes, cassava, and sausage) fried in different types of oils. The values found in this study were smaller than the maximum established by the World Health Organization (WHO)-2002, which specifies that the concentration of acrolein in food does not exceed 40 µg/g. The concentration of acrolein was lower at potatoes fried in soybean oil, due to the lowest content of unsaturated fatty acids present in this oil. In cassava and sausage the concentration of acrolein introduced using corn oil were similar indicating that the oil absorption is independent of the food.

The SPME method used for sampling and extraction of acrolein in different matrices showed appropriate, considering the simplicity and rapidity in the analytical process. Gas chromatography with mass spectrometry provided the selectivity, accuracy, sensitivity, and reliability required for the studies. All results found for these parameters were appropriate for the purpose of study.

Keywords: Acrolein, fried foods, gas chromatography, exhaled air, ambient air.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: Introdução.....	v
1- INTRODUÇÃO.....	2
2- ESTRATÉGIA DE TRABALHO.....	4
2.1- Critério para escolha da matriz estudada.....	4
2.2- Otimização das condições analíticas para análise da acroleína.....	4
CAPÍTULO 2: Revisão Bibliográfica.....	5
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1-Acroleína: Formação, fonte de exposição e toxicologia.....	6
2.2- Exposição Ocupacional e legislações.....	9
2.2.1 – Legislação Espanhola.....	9
2.2.2 – Legislação Americana.....	10
2.2.3 – Legislação Brasileira.....	11
2.3- Métodos Analíticos e Trabalhos desenvolvidos para identificação de acroleína em alimentos.....	11
2.4- Métodos Analíticos e Trabalhos desenvolvidos para identificação de acroleína em ar ambiente e ar expirado.....	15
2.5- Derivatização e reação acroleína com 2,4-DNPH.....	16
2.6- Métodos de amostragem de compostos carbonílicos no ar ambiente e ar expirado.....	18
2.7- Método de extração por SPME.....	20
2.8- Tipos de derivatização por SPME.....	23
2.9- Geração de Padrões Gasosos.....	25
2.10- Planejamento Fatorial.....	27
2.11- Parâmetros de mérito.....	28
2.11.1- Linearidade.....	28
2.11.2- Precisão.....	29
2.11.3- Limite de detecção.....	30
2.11.4- Limite de quantificação.....	31
CAPÍTULO 3: Determinação de acroleína em alimentos.....	32

3- OBJETIVO.....	33
3.1- Objetivo geral.....	33
3.2- Objetivo específico.....	33
3.3-PARTE EXPERIMENTAL.....	34
3.3.1-Reagentes.....	34
3.3.2-Equipamentos.....	34
3.3.3-Preparo das soluções.....	35
3.3.4-Amostras.....	36
3.3.5- Condições cromatográficas para análises dos alimentos.....	36
3.3.6- Método de Extração por SPME.....	37
3.3.7- Planejamento Fatorial.....	37
3.3.8- Perfil dos ácidos Graxos.....	38
3.3.8.1-Preparoda amostra.....	38
3.3.8.2-Metilaçãodosácidosgraxos.....	39
3.3.8.3- Condições cromatográficas para análises dos ácidos graxos nos óleos..	39
3.4-RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	40
3.4.1- Planejamento fatorial 2 ⁴	40
3.4.2- Obtenção do espectro e cromatograma da acroleína.....	43
3.4.3-Parâmetrosde Mérito.....	45
3.4.3.1-Curvadecalibração.....	46
3.4.4- Aplicação do método GC/MS proposto para análise de acroleína em batata frita.....	50
3.4.5- Aplicação do método GC/MS proposto para análise de acroleína em mandioca e linguiça frita.....	59
3.4.6-Conclusão.....	61
CAPÍTULO 4: Análise de acroleína no ar ambiente e ar expirado.....	62
4- OBJETIVO.....	63
4.1- Objetivo geral.....	63
4.2- Objetivo específico.....	63
4.3-PARTE EXPERIMENTAL.....	64
4.3.1-Reagentes.....	64

4.3.2-Equipamentos.....	64
4.4- Sistema Cromatográfico.....	65
4.5- Sistema de Geração de Padrões Gasosos.....	65
4.6- Coleta das Amostras de ar expirado e ar ambiente.....	67
4.7 – Derivatização na fibra por SPME.....	69
4.8- Estudo de alguns parâmetros de mérito.....	70
4.9-RESULTADOSEDISCUSSÕES.....	71
4.9.1- Planejamento fatorial 2 ³	71
4.9.2-Validaçãodametodologia.....	73
4.9.3- Análise de acroleína no ar expirado de fumantes e não fumantes.....	77
4.9.4- Análise de acroleína em ar ambiente interno e externo.....	81
4.9.5-Conclusão.....	83
CAPÍTULO 5: Considerações finais.....	85
5- Considerações finais.....	86
CAPÍTULO 6: Referência Bibliográfica.....	88

LISTA DE FIGURA

Figura 1: Fórmula estrutural da acroleína.....	6
Figura 2: Fontes de emissão de acroleína (adaptada da ref. [10]).....	7
Figura 3: Caminhos para formação de acroleína a partir de triglicerídeos.....	12
Figura 4: Via metabólica de obtenção de acroleína pela transformação do 3-hidroxiopropanal (adaptado da ref. [41]).....	14
Figura 5: Reação de CC com 2,4-DNPH para formação de hidrazonas.....	17
Figura 6: Perfil da excreção pulmonar de um solvente para uma expiração simples. (adpatado da ref. [51]).....	20
Figura 7: método de extração por SPME.....	21
Figura 8: Extração por SPME no modo headspace (a), e por imersão direta (b)..	22
Figura 9: Derivatização na fibra após amostragem do analito.....	24
Figura 10: Amostragem e derivatização simultâneas na fibra.....	25
Figura 11: Planejamento 22 com ponto central.....	28
Figura 12: Sistema de GC/MS (Thermo-Finnigan com detector de espectrometria de massa) contendo um dispositivo SPME inserido no injetor...	35
Figura 13: Gráfico de Pareto estudado na otimização (A) tempo de extração, (B) temperatura de extração, (C) concentração salina, (D) tempo de dessorção....	41
Figura 14: Cromatograma de íon selecionado (a) e espectro de massas (b) do padrão acroleína-DNPH por GC/MS, para m/z 236.....	44
Figura 15: Espectro de massa para acroleína-DNPH.....	45
Figura 16: Curva de calibração para solução de acroleína-DNPH com amostragem por SPME e análise por GC/MS.....	46
Figura 17: Curva de calibração para acroleína-DNPH em solução com amostragem por SPME.....	48
Figura 18: Concentração de acroleína durante a re-utilização dos óleos.....	52
Figura 19: Concentração de acroleína em batata frita.....	55
Figura 20: Análise de acroleína em batatas fritas comerciais.....	57
Figura 21: Análise de acroleína em mandioca e lingüiça frita.....	58
Figura 22: Análise de acrolaína em mandioca e lingüiça frita.....	59

Figura 23: Fluxograma do sistema de geração de vapores pelo método de permeação.....	66
Figura 24: Sistema de gerador de vapores gasosos disponível no Departamento de Química - UFMG.....	67
Figura 25: : Amostrador para coleta de ar expirado.....	68
Figura 26: Gráfico de pareto para otimização de derivatização na fibra.....	73
Figura 27: Cromatograma de íons totais (a) e espectro de massas (b) para análise de acroleína-DNPH com derivatização na fibra.....	75
Figura 28: Curva de calibração para solução de acroleína-DNPH com amostragem por SPME e análise por GC/MS.....	76
Figura 29: Concentração de acroleína em ar expirado de indivíduos fumantes e não fumantes.....	78
Figura 30: Concentração($\mu\text{g}/\text{m}^3$) de acroleína em ar ambiente.....	82

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Efeitos da acroleína após exposição no ar (adaptado do ref. [2]).....	7
Tabela 2: Concentração de acroleína na fumaça principal do cigarro. (adaptada da ref. [11]).....	8
Tabela 3: Características das fibras de SPME.....	23
Tabela 4: Variáveis estudadas no planejamento 2^4	38
Tabela 5: Fatores do planejamento fatorial 2^4 , com 19 experimentos.....	40
Tabela 6: Resultado da análise de variância da curva analítica.....	47
Tabela 7: Valores de LD, RSD e r^2 para análise de acroleína em matrizes de alimento.....	49
Tabela 8: Valores médio de concentração de acroleína em batata frita.....	51
Tabela 9: Teor de ácidos graxos e viscosidade dos óleos.....	54
Tabela 10: Variáveis estudadas no planejamento 2^3	69
Tabela 11: Fatores do planejamento fatorial 2^3 , com 11 experimentos.....	72
Tabela 12: Concentração ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) de acroleína em ar expirado de indivíduos fumantes e não fumantes.....	78
Tabela 13: Teste ANOVA.....	80
Tabela 14: Concentração ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) de acroleína em ar ambiente.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT/CB-05

ACGIH	Conferência Americana dos Higienistas Industriais (<i>American Conference of Governmental Industrial Hygienists</i>)
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAR	Carboxen
CC	Compostos Carbonílicos
CV	Coeficiente de variação
CW	Polietilenoglicol Carbowax
CX	Carboxen
DCE	Detectores de Captura de Elétrons
DVB	Divinilbenzeno
EI	Impacto eletrônico (Electronic Impact)
EPA	Agência de Proteção Ambiental (<i>Environmental Protection Agency</i>)
FID	Detectores de Ionização por Chama (Flame Ionization Detector)
F_R	Razão entre as Médias Quadráticas
GC	Cromatografia Gasosa (Gas Chromatography)
GC/MS	Cromatografia a Gás Acoplada à Espectrometria de Massas (<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>)
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (<i>High-Performace Liquid Chromatography</i>)
IARC	Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (<i>International Agency for Research on Cancer</i>)
LD	Limite de Detecção
LEO	Limite de Exposição Ocupacional
LQ	Limite de Quantificação
MMQP	Método dos Mínimos Quadrados Ponderado
MQ_R	Média Quadrática da Regressão
MQ_r	Média Quadrática dos Resíduos

NIOSH	Instituto Nacional de Saúde e Segurança Ocupacional <i>(Occupational National Institute for Occupational Safety and Health)</i>
NIST	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia <i>(National Institute of Standards and Technologies)</i>
NPD	Detectores de Nitrogênio e Fósforo
NR 15	Norma Regulamentadora 15
PA	Poliacrilato
PDMS	Polidimetilsiloxana
PFBHA	
pH	Potencial Hidrognênico
ppm	Parte por milhão
R2	Coeficiente de determinação
RSD	Desvio Padrão Relativo (Relative Standard Deviation)
SPE	Extração em Fase Sólida (Solid Phase Extraction)
SPME	Micro Extração em Fase Sólida (Solid Phase Microextraction)
STEL	Limite de Exposição em Curto Prazo <i>(Short Term Exposure Limit)</i>
TLV	Limite de Exposição Ocupacional (Short Term Exposure Limit)
USA	Estados unidos da América (United States of America)
2,4-DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina

CAPÍTULO 1: Introdução

1- INTRODUÇÃO

Os compostos carbonílicos (CC), aldeídos e cetonas podem ser emitidos diretamente para atmosfera através de fontes naturais ou antropogênicas. As fontes antropogênicas estão diretamente ligadas às atividades humanas, sendo assim os CC podem ser encontrados na queima de combustível, tabaco, gorduras animais e óleos vegetais, incineração de lixo entre outras. Como fontes naturais temos a queima espontânea de florestas, excrementos de animais e os gases vulcânicos, sendo que estes últimos contribuem com uma menor liberação destes compostos para a atmosfera. [1]

Algumas indústrias que sintetizam e/ou usam os compostos carbonílicos como matéria prima como as refinarias e a petroquímica; plantas de tratamento de esgotos; indústrias de plásticos, de tintas e vernizes, entre outras, também tem contribuído para a emissão desses compostos na atmosfera em grande quantidade. As emissões podem ocorrer nas várias etapas do processo industrial através de escapamentos na linha, queima de combustíveis, esgotos industriais, armazenamento e transporte. [2]

Os compostos carbonílicos mais abundantes são o formaldeído (HCHO) e o acetaldeído (CH₃CHO). Uma pequena quantidade, cerca de 10%, existe na atmosfera sob forma de propionaldeído (CH₃CH₂CHO), propanona (CH₃COCH₃), acroleína (CH₂=CHCHO) e benzaldeído (C₆H₅CHO), entre outros. [3]

Em áreas urbanas a principal fonte de emissão de compostos carbonílicos para a atmosfera tem sido a queima de combustíveis afetando diretamente a concentração desses compostos no ar. Por sua vez, essas emissões dependem principalmente do combustível utilizado, do uso de catalisadores, e das condições do veículo e de tráfego [4]. No Brasil, com o uso de combustíveis oxigenados, torna-se significativa a quantidade de compostos carbonílicos emitidos por veículos automotores.

Nos últimos anos a preocupação relacionada com a poluição do ar em ambientes internos tem aumentado. Em ambientes internos os compostos carbonílicos são liberados por diversas fontes. Estudos têm sido realizados

indicando a presença desses compostos em materiais de construção, incluindo a madeira e carpetes [5]. Outras fontes de compostos carbonílicos incluem a fumaça de cigarro e a queima de óleos ou gorduras animais e vegetais. [6]

Acroleína, o analito de interesse deste estudo é muito encontrada em alimentos fritos proveniente da desidratação do glicerol durante o processo de fritura e em bebidas alcoólicas como vodcas, vinhos, cervejas e cachaça podendo ser formada pela fermentação alcoólica. [7]

Embora se saiba que a acroleína pode ser encontrada em determinados alimentos, a quantidade neles existentes e a quantidade ingerida ainda não foi estudada e pouco se conhece sobre o risco à saúde em relação a exposição à acroleína no ambiente devido à falta de métodos adequados para determinação deste composto em nível ambiental.

A acroleína é conhecida como irritante de olhos e mucosas nasais classificado como não carcinogênico (classe 3) pela IARC (*International Agency for Research on Cancer*) [8]. Este composto foi um gás usado na primeira Grande Guerra como arma química cuja função principal era atuar como gás lacrimogêneo e irritante dos pulmões. [7]

O objetivo do presente estudo foi o desenvolvimento de um método para determinar acroleína em diferentes matrizes como alimento frito, ar ambiente e ar expirado. Os objetivos específicos foram quantificar acroleína em batata, mandioca e linguiça utilizando diferentes tipos de óleos no processo de fritura desses alimentos e determinar acroleína no ar ambiente proveniente da queima de combustíveis e ar expirado avaliando a contaminação em indivíduos fumantes e não fumantes. A técnica de microextração em fase sólida (SPME) e Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massas foram às técnicas selecionadas para amostragem e quantificação do analito, respectivamente.

1.1- ESTRATÉGIA DE TRABALHO

1.1.1- Critério para escolha da matriz estudada

Para este estudo foram escolhidas duas matrizes, alimento e ar, para desenvolvimento de método e quantificação de acroleína.

Os alimentos analisados foram: batata, mandioca e linguiça. Foram utilizados óleos de soja, milho, girassol, canola e dendê para fritura, com o objetivo de avaliar a contaminação do alimento pela acroleína produzida através de aquecimento e reaquecimento do óleo.

Acroleína também foi analisada em ar ambiente e ar expirado provenientes da queima de combustíveis (ar ambiente) e pela contaminação do indivíduo através da queima de cigarro (ar expirado).

1.1.2. Otimização das condições analíticas para análise da acroleína

A técnica de extração SPME por imersão foi utilizada juntamente com cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (GC/MS) para análise do composto carbonílico. A fibra utilizada foi a de poliacrilato (PA) com característica polar sendo realizada a derivatização do analito na solução para análise dos alimentos e derivatização do analito na fibra para análise do ar ambiente e ar expirado.

CAPÍTULO 2: Revisão Bibliográfica

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- Acroleína: Formação, fonte de exposição e toxicologia

Acroleína é um composto carbonílico, α,β -aldeído insaturado, conhecido também como, aldeído acrílico, acrilaldeído ou 2-propenal. Sua fórmula estrutural está representada na Figura 1.

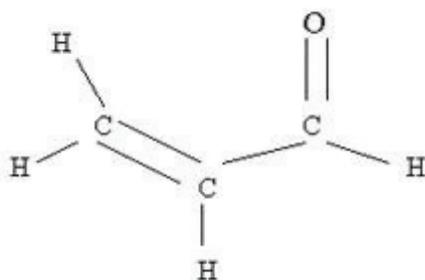


Figura 1: Fórmula estrutural da acroleína

Aldeídos saturados podem ser formados pela condensação aldólica. No preparo industrial de acroleína a condensação envolve uma molécula de acetaldeído e uma molécula de formaldeído. O aldol formado perde uma molécula de água e forma acroleína, segundo o mecanismo de condensação aldol. [9]

Acroleína é volátil e altamente inflamável sendo capaz de sofrer polimerização espontânea. É tóxica, seus vapores podem causar severas irritações respiratórias e oculares e se ingerida provoca náusea, vômito, colapso e coma [7]. Sua principal via de ataque são as mucosas do trato respiratório superior podendo produzir edema pulmonar em altas concentrações. O contato com acroleína líquida pode produzir necrose da pele ou dos olhos.

A polimerização deste composto ocorre de forma violenta quando ocorre contato com materiais alcalinos ou ácidos. A dimerização da acroleína é muito lenta à temperatura ambiente, podendo tornar-se muito rápida a temperaturas elevadas ($\sim 90^\circ\text{C}$).

A Tabela 1 apresenta algumas conseqüências de exposição à acroleína no ar ambiente:

Tabela 1: Efeitos da acroleína após a exposição no ar (adaptado da ref.[2])

Concentração de acroleína (mg/L)	Efeitos
0,2	Irritação nos olhos
0,8	Irritação em mucosas
5,5	Irritação intensa
≥ 10	Morte em curto tempo

A acroleína é diariamente introduzida no ambiente por diversas fontes como: queima de gasolina, fumaça de cigarro, aquecimento de gorduras, processos industriais e incêndio em vegetação. [9]. Uma estimativa indica que a acroleína representa 5% do total de aldeídos poluentes do ar, sendo o formaldeído o maior contaminante dentre eles. [10]

A Figura 2 apresenta as principais fontes de emissão de acroleína em 2005 nos EUA. Observa-se que a queima de floresta contribui com maior contaminação de acroleína no ambiente.

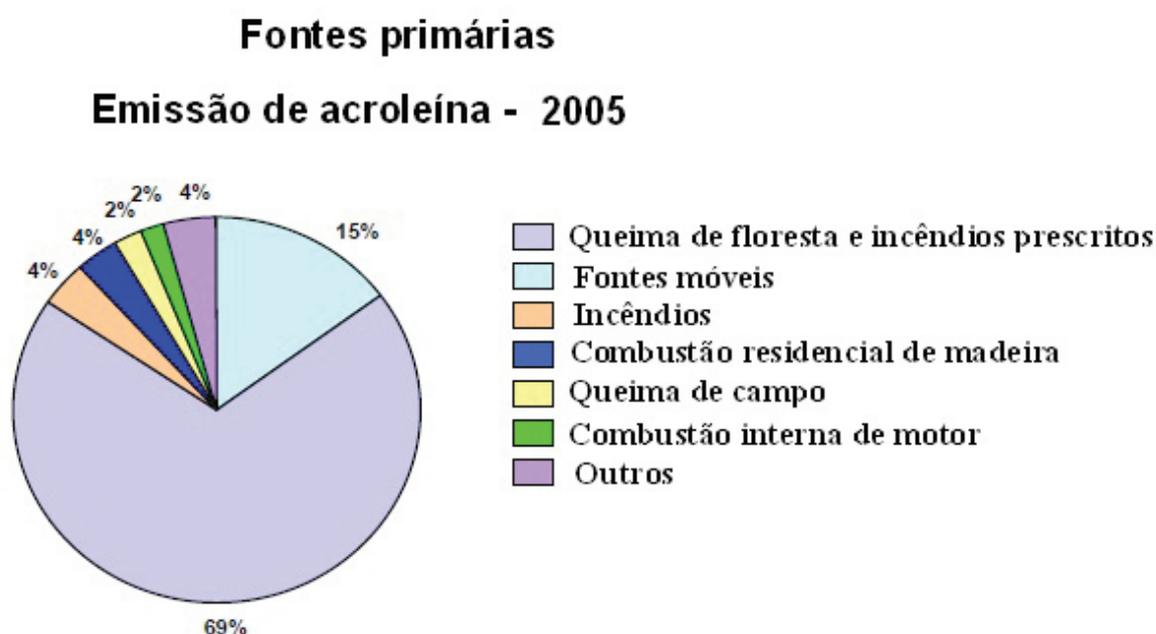


Figura 2: Fontes de emissão de acroleína (adaptada da ref. [11])

Industrialmente, a acroleína é usada como herbicida ou fungicida e pode ser usada também como um material de partida para a produção de ácido acrílico. Ambientalmente, a acroleína existe naturalmente em alimentos e é formada durante a combustão de materiais orgânicos. Acroleína também é encontrada em todos os tipos de cigarros e em vapores provenientes da combustão de óleo de cozinha onde tem ocorrido graves exposições tóxicas aos seres humanos. [10]

Acroleína tem sido registrada como um dos componentes do fumo do cigarro responsável pelo mau hálito na boca do fumante. A Tabela 2 apresenta alguns tipos de cigarros da Empresa Souza Cruz e os valores da concentração de acroleína como um dos principais constituintes da fumaça. A fumaça principal é considerada a fumaça inalada pelo fumante.

Tabela 2: Concentração de acroleína na fumaça principal do cigarro. (adaptada da ref. [12])

Cigarro	Concentração ($\mu\text{g}/\text{cigarro}$)
Carlton by Dunhill Red Ks	33,910 \pm 5,086
Derby Azul Mar Ks	32,990 \pm 4,948
Derby Vermelho Sol Ks	41,040 \pm 6,156
Free Citric Mis Ks	46,120 \pm 3,298
Hollywood America Ks	34,100 \pm 5,115

Aproximadamente 50% da acroleína produzida é usada como matéria prima para produção de glicerina e 25% para produzir o aminoácido metionina, uma proteína essencial adicionada em vários alimentos. Os 25% restantes são usados na produção de compostos como: glutaraldeído, 1,2,6-hexanotriol, quinolina, penta-eritritol, cicloalifático epóxi resina e produtos químicos para tratamento de água [2].

A EPA (*Environmental Protection Agency*) [13] nos EUA identificou a acroleína

em pelo menos 31 dos 1.662 locais de análise resíduos perigosos dos Estados Unidos da América. [14]

O limite de percepção olfativa da acroleína no ambiente é de 0,21 mg/L e concentrações dez vezes maiores são consideradas perigosas à vida e à saúde. [15]

2.2- *Exposição ocupacional e legislações*

A exposição ocupacional é definida por Della Rosa et al. [16] como a situação decorrente de uma atividade profissional em que o trabalhador tem contato com um agente químico de tal forma que há possibilidade de produção de efeitos locais e sistêmicos em curto, médio ou longo prazo.

A avaliação da exposição se dá através da medida de concentração de agentes químicos em amostras ambientais, como ar, água – monitoramento ambiental – ou por medidas de parâmetros biológicos – monitorização biológica – denominados biomarcadores. [17]

Desta forma, o biomarcador compreende toda substância, ou seu produto de biotransformação, assim como quaisquer alterações bioquímicas precoces, cuja determinação esteja associada à intensidade da exposição, ou ao risco à saúde. O biomarcador de exposição é aquele que estima a dose interna do agente químico no organismo, através da “determinação da substância química ou seu produto de biotransformação em fluídos biológicos como sangue, urina, ar expirado e outros” [18].

2.2.1 – *Legislação Espanhola*

O INSHT – Instituto Nacional de Segurança e Higiene da Espanha – promulgou uma lei que estabelece os limites de exposição ocupacional (L.E.O) a compostos químicos no ambiente ocupacional [19]. O limite de exposição adotado para a exposição diária (8h) é de 0,23 mg/m³ e de curta duração (15 min) de 0,69 mg/m³ para a acroleína.

2.2.2 - Legislação Americana

AACGIH [20] (*American Conference of Governmental Industrial Hygienists*) é uma organização dedicada aos aspectos técnicos e administrativos da Saúde Ocupacional e Ambiental a qual recomenda o limite de exposição ocupacional. Existem três classificações pela ACGIH - EUA para os tipos de limites de exposição: TLV-TWA é a média ponderada, ou seja, a concentração média ponderada pelo tempo para uma jornada normal de 8 horas diárias e 40 horas semanais, para a qual a maioria dos trabalhadores pode estar repetidamente exposta, dia após dia, sem sofrer efeitos adversos à saúde. O TLV-STEL é o limite de exposição de curto prazo; ou seja, a concentração máxima permitida em um período de 15 minutos por no máximo 3 vezes por dia de 8 horas. Deve existir um intervalo mínimo de 60 minutos entre as exposições sucessivas nessa faixa. O TLV-C que é o limite de exposição – valor teto, que não pode ser excedida durante nenhum momento da exposição do trabalhador.

A OSHA [21] (*Occupational Safety and Health Administration*) estabelece as normas de exposição ocupacional nos EUA. Ambos os órgãos (ACGHI e OSHA) apresentam um consenso nos valores de limite de exposição ocupacional para a acroleína. O limite de exposição de acroleína de acordo com a ACGIH é de 0,10 mg/m³ para 15 min de exposição (TLV-STEL). A legislação não estabelece o limite para 8 horas de exposição.

ANIOSH (*National Institute for Occupational Safety and Health*) agência do Governo Americano recomenda limites de exposição de até 2 ppm ar ambiente.

A EPA (*Environmental Protection Agency*) nos EUA determina para a proteção da saúde humana uma concentração máxima de acroleína em água potável e organismos aquáticos de 0,320 e 0,780 mg/L respectivamente.

De acordo com WHO (*World Health Organization*) (2002), as concentrações de acroleína em alimentos são geralmente menores que 40 µg/g com maior concentração de 1,0 µg/g ou menos. [22]. O órgão americano FDA (*Food and Drug Administration*) [23] determinou que os níveis de acroleína utilizados para preparar alimentos de amido modificado não deve ser superior a 0,6% m/m.

2.2.3 – Legislação Brasileira

A Portaria Ministerial 3.214, do Ministério do Trabalho e Emprego, de dezembro de 1978, que possui a Norma Regulamentadora 15 (NR 15) que estabelece parâmetros de segurança para atividades insalubres na qual estabelece os limites de tolerância para substâncias químicas, não estabelece valores de limite de exposição ocupacional para a acroleína [24].

A Legislação Brasileira, portanto é omissa mostrando que os trabalhadores brasileiros podem estar sendo exposto a valores prejudiciais à saúde.

Na área de alimentos, a ANVISA [25] coordena, supervisiona e controla as atividades de registro, informações, inspeção, controle de riscos e estabelecimento de normas e padrões. O objetivo é garantir as ações de vigilância sanitária de alimentos e os limites de contaminantes, porém a ANVISA não estabelece limite de concentração de acroleína em alimentos.

2.3- Métodos Analíticos e Trabalhos desenvolvidos para identificação de acroleína em alimentos.

Isolar acroleína da matriz, principalmente de gorduras (para análise de alimentos) é um procedimento analítico difícil devido à sua alta volatilidade, alta reatividade e sua capacidade de polimerização [26]. Com a derivatização torna-se possível o aumento na resposta do detector e a seletividade do analito tornando as análises mais seguras, uma vez que a acroleína é altamente volátil e reativa. [27]

Devido à alta instabilidade da acroleína, é comum o emprego de agentes derivatizantes para análise principalmente em HPLC (Cromatografia Líquida de alta eficiência). Muitos agentes derivatizantes como hidroxilamina, 5,5-dimetil-1,3-ciclo-hexanodiona, MBTH (N-metil-benzotiazolon-(2)-hidrazona), PFPH (pentafluorophenylhidrazina) e 2,4-DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina) são empregados para análise de aldeídos e cetonas.

Para selecionar o agente derivatizante alguns fatores são importantes:

- * Formação de um produto estável na reação entre reagente e analito;
- * A velocidade da reação entre o reagente e o analito deve ser alta o suficiente para conseguir uma reação quantitativa;
- * Para análise por cromatografia a gás, uma alta volatilidade dos derivatizados é favorável;
- * Para amostragem em fase gasosa, o agente derivatizante não deve ser muito volátil. [28]

Os compostos carbonílicos derivados com 2,4-DNPH podem ser analisados por HPLC ([29]; [30]; [31]; [32]; [33]; [34]; [35]) ou GC/MS ([36]; [37]; [38]; [39]). Alguns autores mencionam as vantagens da análise por HPLC devido sua robustez e boa repetibilidade que o torna o mais utilizado para as análises, porém métodos (GC/MS) tem a vantagem de melhor separação em relação ao HPLC principalmente em matrizes complexas. [36]

São encontrados na literatura poucos trabalhos que utilizam GC/MS para análise de acroleína em matrizes complexas como alimentos e que avaliam a contaminação causada pelo aquecimento de variados tipos de óleo simulando condições de uso em casas, restaurantes ou indústrias.

Umano, K., Shibamoto, T., [40] descreveram três caminhos para formação de acroleína em óleo aquecido. Os resultados são mostrados na Figura 3, sendo o caminho I considerado o principal para a produção de acroleína pela desidratação do glicerol encontrado nos óleos.

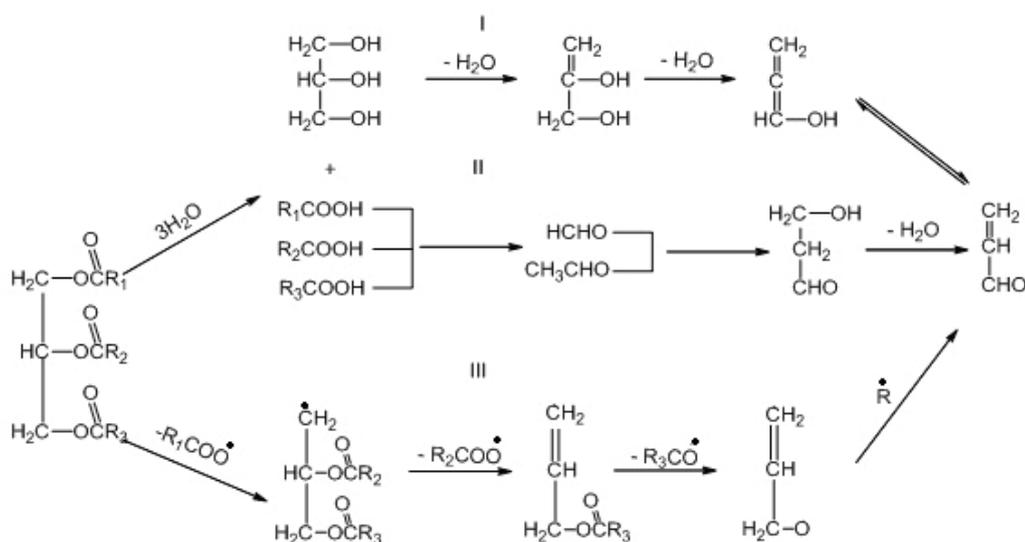


Figura 3: Caminhos para formação de acroleína a partir de triglicerídeos (adaptado ref. [40])

Para extração de acroleína em gorduras aquecidas alguns autores têm utilizado impingers com derivatização por N-methylhydrazine seguido de análise por GC/NPD (Cromatografia Gasosa com detector Nitrogênio e Fósforo) como descrito pelos autores Ghilarducci, D. P. [7], Yasuhara, A. Shibamoto, T. 1991 [41]. Este último usando N-methylhydrazine encontrou quantidades significantes de acroleína em ventilador de cozinha concluindo que a provável fonte de contaminação era o óleo de milho usado na fritura de carnes e peixes. Fullana, A. et al. [37] compararam a presença de aldeídos voláteis em fumaça de óleo de oliva e canola aquecendo-os a 180 °C e 240 °C utilizando GC/MS. Neste estudo os autores observaram que a formação de acroleína aumenta com a elevação da temperatura e que a 240 °C a concentração de acroleína em óleo de canola diminui consideravelmente com o tempo de aquecimento. O mesmo foi observado por Andrew-Sevilla, A. J. et al., [42] que identificaram e quantificaram acroleína por GC/MS nos vapores dos óleos de oliva extra virgem, girassol e palma aquecendo-os a 180 e 240 °C. Eles observaram que a formação de acroleína cresceu significativamente quando a temperatura de cozimento foi aumentada de 180° a 240° C, porém para o óleo de girassol a concentração de acroleína diminuiu durante o tempo de aquecimento para a temperatura de 240 °C. Ambos os autores, Fullana e Andrew-Sevilla aqueceram os óleos em reatores com coleta em bolsa (Tedlar). Lane, R. H. et. al [38], determinaram acroleína em filé de peixe frito aquecido a 182° e 204° C em óleo fresco e usado por cromatografia líquida por fase reversa e GC/MS encontrando 0,1 mg/L de acroleína em ambas análises.

Umano, K., Shibamoto, T. [40], analisaram por headspace o vapor do aquecimento de gorduras utilizando a derivatização com Morpholine e análise por GC com detector termoiônico e não encontraram a formação de acroleína quando o óleo de milho foi aquecido a 180 °C.

A acroleína pode ser produzida também pela transformação de 3-hidroxiopropanal produto muito comum em cidras. A formação de acroleína em vinhos provoca uma alteração conhecida como “pique acroleique” dando um aroma de pimenta e uma sensação picante e irritante nas bebidas.

Em bebidas alcoólicas, a presença de compostos carbonílicos de baixa

massa molecular (C1-C6) é indesejável por serem responsáveis por propriedades organolépticas desagradáveis. Além do mais, a presença de alguns compostos carbonílicos em bebidas alcoólicas pode resultar em efeitos tóxicos mutagênicos e cancerígenos. [43]

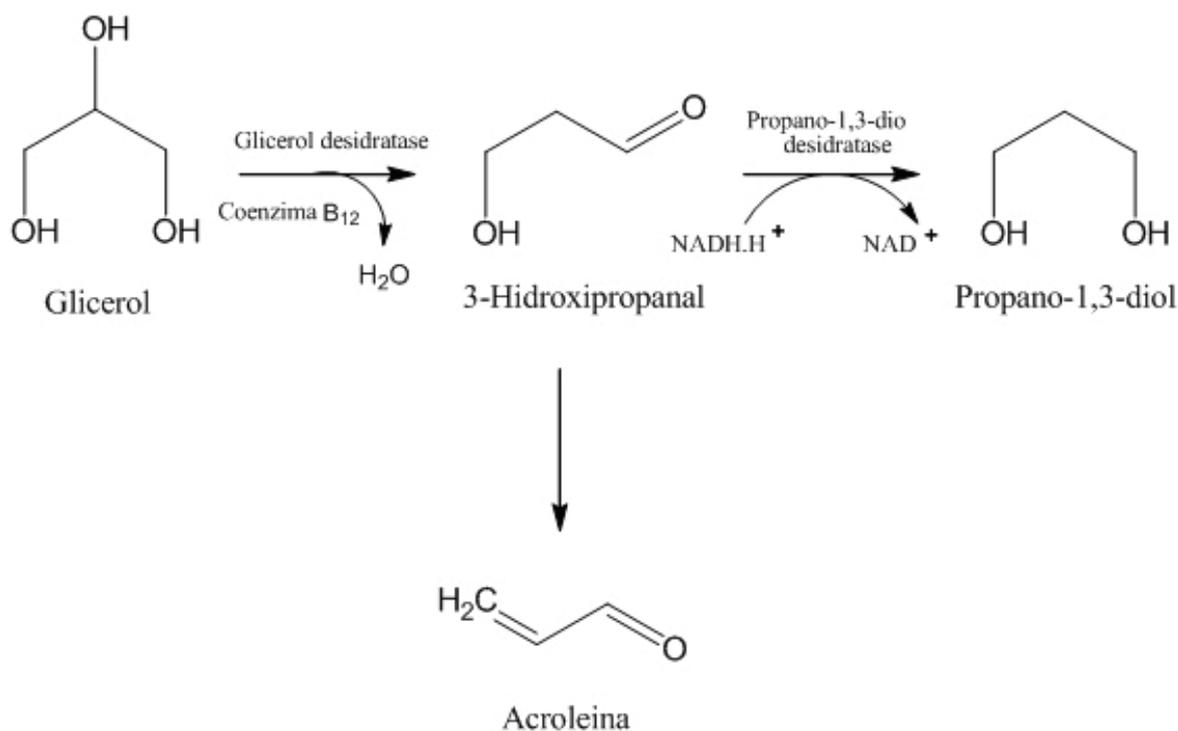


Figura 4: Via metabólica de obtenção de acroleína pela transformação do 3-hidroxiopropanal (adaptado da ref. [44]).

Saison D., et al. [45] determinaram 41 tipos de compostos carbonílicos em cerveja por derivatização com PFBHA. O método de extração foi SPME no modo headspace com fibra de PDMS/DVB e a técnica GC/MS. Para análise de acroleína o autor obteve boa linearidade ($R^2 = 0,997$) em larga escala de concentração (0,8-256 $\mu\text{g/L}$), CV de 5,09%, limite de quantificação e limite de detecção de 0,24 $\mu\text{g/L}$ e 0,81 $\mu\text{g/L}$ respectivamente.

Waldemar W. [43], et al determinaram compostos carbonílicos em vodcas utilizando PFBHA como agente derivatizante, SPME como técnica de extração e subsequente análise por GC-DCE. Para determinação de acroleína o método desenvolvido obteve coeficiente de correlação de 0,9799 (concentração variando de 8,00 $\mu\text{g/L}$ a 0,32 mg/L) com RSD de 5,5%. O autor observou uma queda

no rendimento da extração, o que pode ser causado devido à instabilidade do aldeído a elevadas temperaturas.

2.4- Métodos Analíticos e Trabalhos desenvolvidos para identificação de acroleína em ar ambiente e ar expirado.

No Brasil, a poluição ambiental de cidades pode ser considerada praticamente veicular, embora até recentemente acreditava-se que a principal fonte de poluição ambiental fosse a indústria. Em meados de 1980, algumas medidas indicaram que em grandes centros a poluição veicular é predominante.

Em 2004, a contribuição para a poluição atmosférica pelos automóveis foi estimada em 77%, 98% e 95% nas cidades do Rio de Janeiro, São Paulo e Porto Alegre, respectivamente. [31]. E o estudo realizado por Faiz, 1995 [46] mostrou que os automóveis são as principais fontes de poluição na cidade do México, Santiago e Caracas.

Aldeídos e cetonas representam uma classe significativa de compostos carbonílicos orgânicos reativos presentes na atmosfera. Uma preocupação recente tem obrigado os fabricantes de automóveis a terem um controle da emissão desses aldeídos durante a queima de combustível.

Outra preocupação tem sido em relação à poluição em ambientes internos. Altas concentrações de acroleína em ambientes fechados como salas, cozinhas e ambientes de lazer têm sido alvos de pesquisas recentes. As principais fontes de contaminação em ambientes internos são o cigarro e o queima de óleo utilizado no preparo de refeições.

Em um trabalho desenvolvido por Vicente Seaman, [47], as concentrações de acroleína analisadas em residências foram maiores que a concentração de acroleína em ambiente externo. A concentração em ambientes externos de acroleína variou entre 0,09 e 1,7 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ enquanto que em ambientes internos variou de 2,1 a 12,2 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. O autor coletou amostras em horários pela manhã e a tarde depois do meio dia e concluiu que concentrações de acroleína foram maiores nas amostras coletadas a tarde devido as atividades domésticas.

No final dos anos 50 uma atenção considerada foi focada para o desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de constituintes do cigarro, incluindo acroleína e 1,3-butadieno devido a sua alta contaminação. [32]

Dong, J. Z. [36] descreveu um método por GC/MS com coleta por impinger para análise de compostos carbonílicos em fumaça de cigarro após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). O método proposto é linear com R^2 igual 0,998. Os limites de detecção e de quantificação obtidos para acroleína foram 1,41 and 4,7 $\mu\text{g}/\text{cigarro}$ respectivamente A precisão do método foi de 3,4 a 6,4 % dependendo do tipo de cigarro.

2.5- Derivatização e reação acroleína com 2,4-DNPH

Para os compostos carbonílicos a literatura apresenta vários métodos de derivatização, sendo que os métodos cromatográficos utilizando como reagente de derivatização o reagente 2,4 dinitrofenilhidrazina (DNPH) são os mais utilizados devido a sensibilidade e seletividade. O derivatizante 2,4-DNPH reage seletivamente com aldeídos e cetonas em meio aquoso [28]. A reação específica de compostos carbonílicos (CC) com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) formando os correspondentes 2,4-dinitrofenilhidrazonas é o mais importante método qualitativo e quantitativo de determinação de CC em análises orgânicas. [48]

A reação da acroleína com 2,4-DNPH ocorre com um ataque eletrofílico de um próton pelo oxigênio da carbonila conforme descrito na Figura 5.

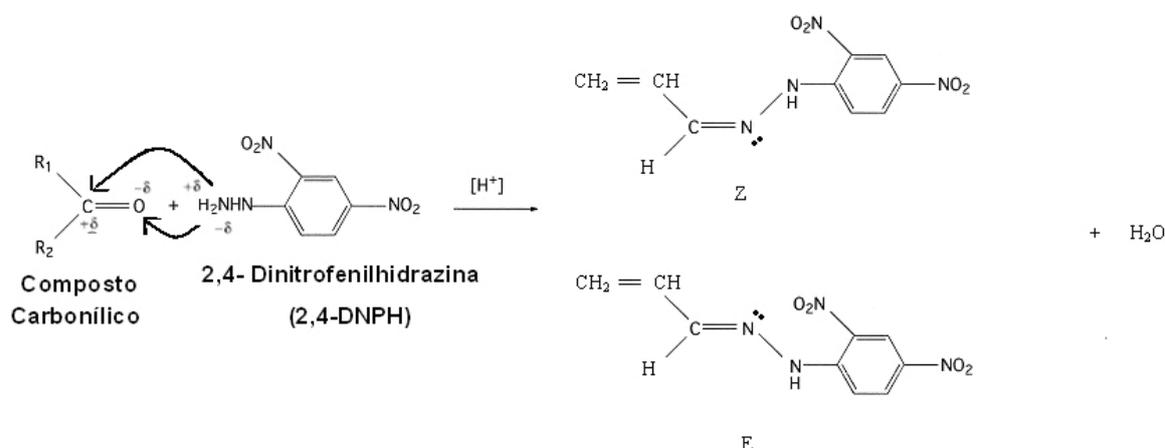


Figura 5: Reação de CC com 2,4-DNPH para formação de hidrazonas.

De acordo com Veloso, et al. (2001) [49] a formação das hidrazonas deve ocorrer em meio ácido, pois a catálise ácida ativa o carbono carbonílico por meio da protonação do oxigênio, tornando-o mais eletrofílico e passível de ser atacado por um nucleófilo fraco como o 2,4-DNPH. O pH é um fator importante nesta reação devido a competição entre a nucleofilicidade e a basicidade do 2,4-DNPH e ao caráter eletrofílico do carbono da grupo carbonila. Em pH baixo o derivatizante 2,4-DNPH atua como base e é protonado, diminuindo sua ação como nucleófilo. O pH alto diminui a reatividade do carbono do grupo carbonila.

Para a acidificação da solução derivatizante 2,4-DNPH encontra-se na literatura o uso de ácido clorídrico, perclórico ou fosfórico sendo que a utilização dos dois últimos permite a injeção direta da solução sendo que o ácido fosfórico permite o aumento da velocidade de derivatização [48]. Em um estudo realizado por Veloso, [27] concluiu-se que a faixa ideal de pH para um melhor rendimento de recuperação dos compostos carbonílicos era entre 1,5 e 2,2.

Segundo os autores Uchiyama, S. et al, 2004 [50] a derivatização com ácido fosfórico leva a formação equilibrada de isômeros E e Z das hidrazonas prevenindo a ocorrência de erros analíticos relacionados com a detecção de apenas isômeros e quando o ácido não é usado na derivatização.

2.6- Métodos de amostragem de compostos carbonílicos no ar ambiente e ar expirado.

A amostragem de componentes com nível de traços na atmosfera tem se tornado um desafio constante, pois o ar é uma matriz ambiental que requer cuidados especiais para se obter amostras representativas. Por ser um sistema multifásico, constituído de gases, partículas líquidas, e sólidas o ar apresenta variações espaciais e temporais em sua composição. [51].

As técnicas mais utilizadas para amostragem de ar ambiente utilizam-se de canister ou bolsas plásticas (principalmente *Tedlar*) onde uma sub amostra é transferida diretamente para o sistema analítico por meio de seringas, ou através de adsorventes sólidos, que são termicamente dessorvidos. Para amostragem de ar expirado os dispositivos utilizados devem garantir uma coleta eficiente da amostra, representando de forma verdadeira o conteúdo do ar expirado durante o tempo de expiração. Para amostragem do ar expirado também são utilizados tubos de vidro, bolsas plásticas (por exemplo, *Saran*, *Mylar*, *Tedlar*), porém a técnica de microextração em fase sólida (SPME) tem se tornado uma técnica promissora para amostragem de ar. [52]

Os métodos de amostragem para componentes do ar atmosférico e ar expirado podem ser divididos em dois principais tipos: amostragem passiva e amostragem ativa.

Amostragem ativa consiste de o ar ser pressurizado para dentro do dispositivo de amostragem com o auxílio de uma bomba, sendo necessária a utilização de medidores de fluxo ou fluxômetros para a determinação do volume de ar ou da taxa de amostragem. Embora o uso de bombas represente uma dificuldade logística, principalmente em áreas remotas, exigindo baterias ou uma linha de energia elétrica, os métodos de amostragem ativa têm sido mais comumente aplicados que aqueles de amostragem passiva no monitoramento de constituintes traços atmosféricos. Amostragem passiva emprega dispositivos (amostradores passivos) capazes de fixar gases ou vapores da atmosfera, a uma taxa controlada por processos físicos, tais como difusão ou permeação, não envolvendo o movimento ativo do ar através do amostrador.

A amostragem pode ser dividida em técnicas sem pré-concentração e técnica com pré-concentração. Nas técnicas sem pré-concentração os dispositivos mais utilizados neste tipo de amostragem para análises de compostos carbonílicos na atmosfera são as bolsas plásticas e os canisters. Em técnicas com pré-concentração a técnica por Microextração em fase sólida (SPME) é uma das principais técnicas que utiliza o processo de sorção e encontra-se melhor descrito no item 2.7.

A amostragem do ar expirado usando SPME pode ser aplicada por meio passivo ou ativo. Amostragem passiva requer a coleta do ar expirado em bolsas plásticas ou outro tipo de amostrador de ar expirado, para extrair posteriormente; e amostragem ativa se refere à coleta do ar expirado enquanto o indivíduo expira diretamente na fibra. [53]

Para uma análise adequada do ar expirado alguns fatores são fundamentais como: (1) definir o melhor momento da amostragem; (2) o tipo de expiração; e (3) o meio de coletar a amostra.

A excreção das substâncias químicas pelo ar expirado ocorre em três etapas mostradas na Figura 6. A primeira etapa (I) corresponde ao ar do espaço morto, o qual contém pouca ou nenhuma quantidade da substância. Após esta etapa, ocorre um rápido aumento da concentração da substância química (II), até atingir um platô da concentração alveolar (III). A terceira etapa (III) apresenta uma suave gradiente, o qual pode ser atribuído à liberação contínua da substância dos alvéolos. Uma rápida diminuição na concentração é observada logo após o final da terceira etapa, quando o indivíduo inala ar limpo (Figura 6).

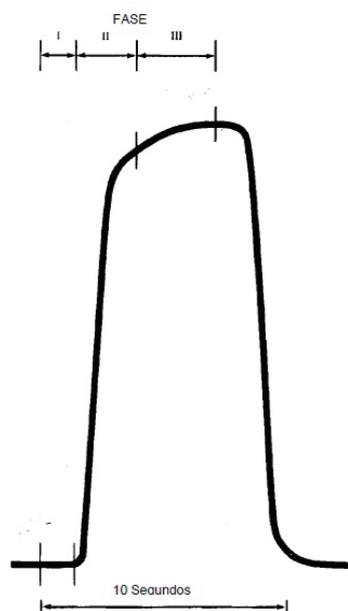


Figura 6: Perfil da excreção pulmonar de um solvente para uma expiração simples. (adaptado da ref. [51])

A coleta da mistura do ar expirado consiste no ar alveolar (III) diluído pelo ar ambiente retido no espaço morto no trato respiratório (boca, nariz, faringe, traquéia e brônquios). Na amostragem com o ar expirado, o primeiro fluxo de ar é desprezado e coleta-se apenas a porção final da expiração. O ar alveolar geralmente é cerca de dois terços do volume total do ar expirado.

2.7- Método de extração por Microextração em Fase Sólida.

A técnica de extração por Microextração em Fase Sólida (SPME) foi desenvolvida em 1990 por Arthur e Pawliszyn [54]. O processo SPME está baseado em equilíbrios simultâneos em sistemas multifásicos. Uma fibra recoberta por um polímero é colocada em contato com a amostra e os analitos são retidos por adsorção ou absorção, e então transferidos para o instrumento analítico [55]. A Figura 7 apresenta um modo de extração e o modo de injeção.

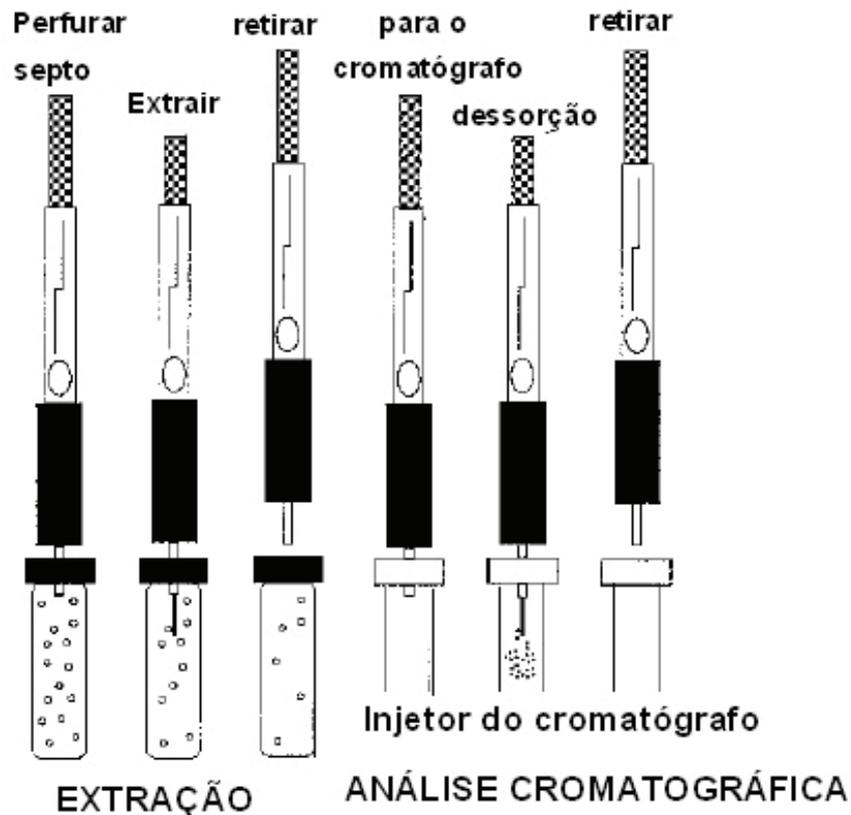


Figura 7: Representação do processo de extração do analito pelo material adsorvente (pela fibra) e dessorção do analito numa análise cromatográfica.

A extração por SPME pode ser feita por imersão direta da fibra na amostra ou no modo headspace onde a fibra não entra em contato direto com a matriz analisada. Por imersão ocorre o processo direto de difusão do analito da matriz para a fibra. No modo headspace a fibra é exposta no espaço gasoso do topo do frasco sem contato direto com a amostra. Os analitos voláteis em equilíbrio com a amostra são extraídos pela fibra. Para facilitar e acelerar a extração o frasco de amostra é colocado sob agitação com controle de temperatura. A Figura 8 mostra os dois modos da extração SPME.

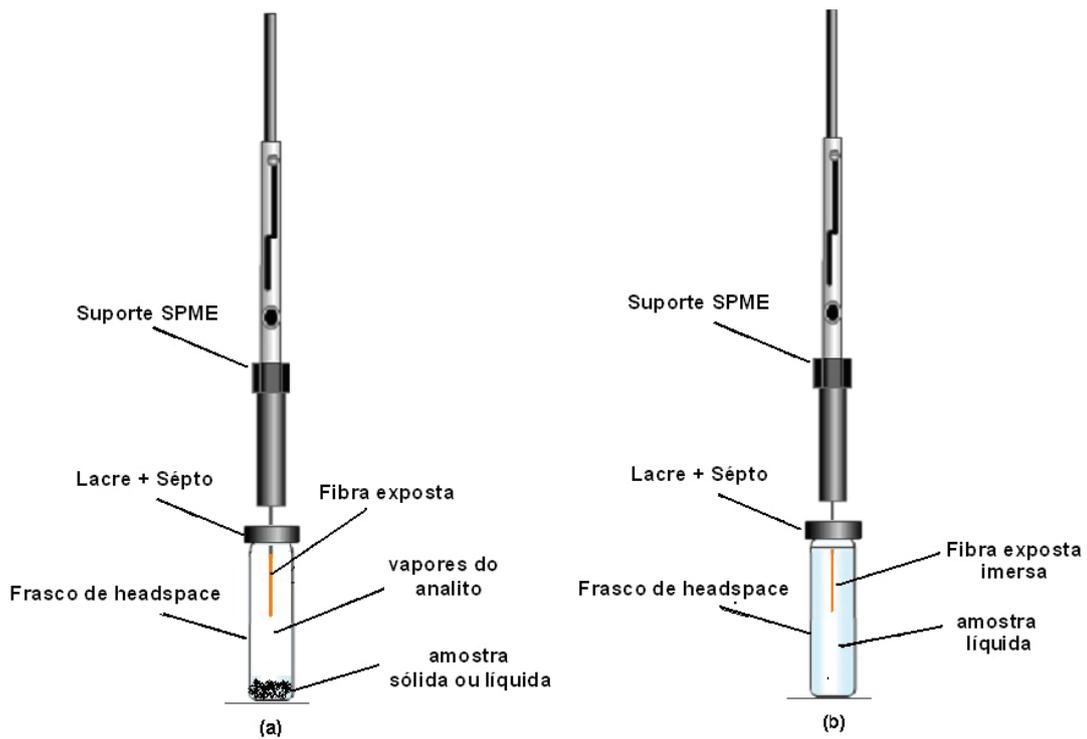


Figura 8: Extração por SPME no modo headspace (a), e por imersão direta (b).

A escolha da fibra depende das características químicas do analito tais como polaridade e volatilidade, da eficiência de absorção/adsorção, da dessorção e também do tipo de aplicação. [56]. A Tabela 3 apresenta os tipos de fibras comerciais suas propriedades e aplicações.

As fibras menos espessas permitem um processo de dessorção mais rápido, uma vez que os analitos se transferem da fibra para o injetor com maior facilidade, produzindo uma fase mais estável a altas temperaturas e permitindo a análise de compostos com pontos de ebulição mais altos. [57]

Tabela 3: Características das fibras de SPME

Fase estacionária	Espessura (μm)	Ligação Química ¹	Volume (μL)
PDMS	100	Não	0,612
	30	Não	0,132
	7	Sim	0,026
PDMS/DVB	65	Parcialmente entrecruzada	0,357
	60	Parcialmente entrecruzada	0,415
CX/PDMS	65	Parcialmente entrecruzada	0,436
CW/DVB		Parcialmente entrecruzada	0,357
CW/TPR ²	50	Parcialmente entrecruzada	0,330
PA	85	Parcialmente entrecruzada	0,616

CW: carbowax; CX: carboxen; DVB: divinilbenzeno; PA: poliacrilato; PDMS: poldimetilsiloxano. TPR: resina suportada. 1- presença de ligação química entre a fase de extração e a fibra de sílica fundida; 2- Não contém cola epóxi. Adaptada da ref. [58]

Existem diferentes tipos de fibras de SPME. As fibras de fase estacionária líquida como a de Poliacrilato – PA, utilizada neste experimento, interagem com o analito por absorção, onde os analitos são extraídos pelo processo de partição. Este processo se baseia na distribuição do analito entre duas fases imiscíveis. As fibras absorventes retêm o analito dentro dos poros internos sendo a extração feita por meio de interações físicas. [57]

Esta técnica de extração tem possibilitado o desenvolvimento de métodos simples, de poucos passos e de relativo baixo custo e foi portanto, selecionada para os estudos deste trabalho.

2.8- Tipos de derivatização por Microextração em Fase Sólida.

Utilizando a técnica de SPME a derivatização pode ocorrer de três modos:

na matriz do analito (1), sobre a fibra SPME após a amostragem (2) ou amostragem e derivatização simultânea na fibra (3). No modo 1 o derivatizante é adicionado á amostra e a reação de derivatização do analito ocorre na solução contendo o analito de interesse. Em seguida uma alíquota desta amostra derivatizada é adicionada ao frasco de vidro e a extração SPME pode ser feita por imersão direta da fibra na solução ou com a fibra no modo headspace.

O modo 2 está representado na Figura 9. A fibra é exposta ao headspace da solução contendo o analito e a extração é efetuada até que o equilíbrio de saturação da fibra pelo analito seja atingido. Em seguida, a fibra saturada com o analito é inserida no headspace do frasco contendo uma solução do derivatizante para que ocorra a derivatização do analito.

A Figura 10 representa o modo 3. A fibra é exposta no headspace da solução derivatizante. Em seguida, a fibra saturada com o derivatizante é exposta no headspace da solução contendo o analito para que ocorra sua extração e derivatização simultânea.

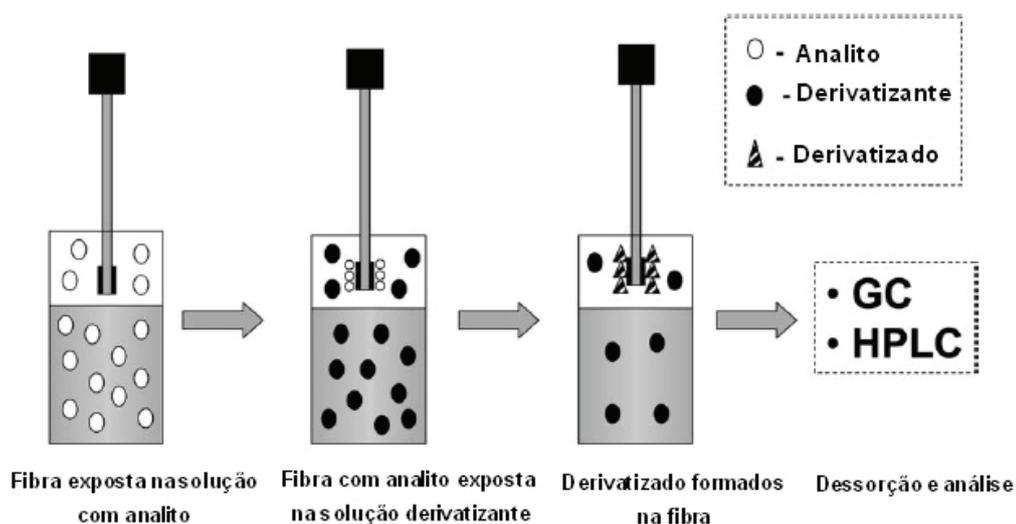


Figura 9: Derivatização na fibra após amostragem do analito.

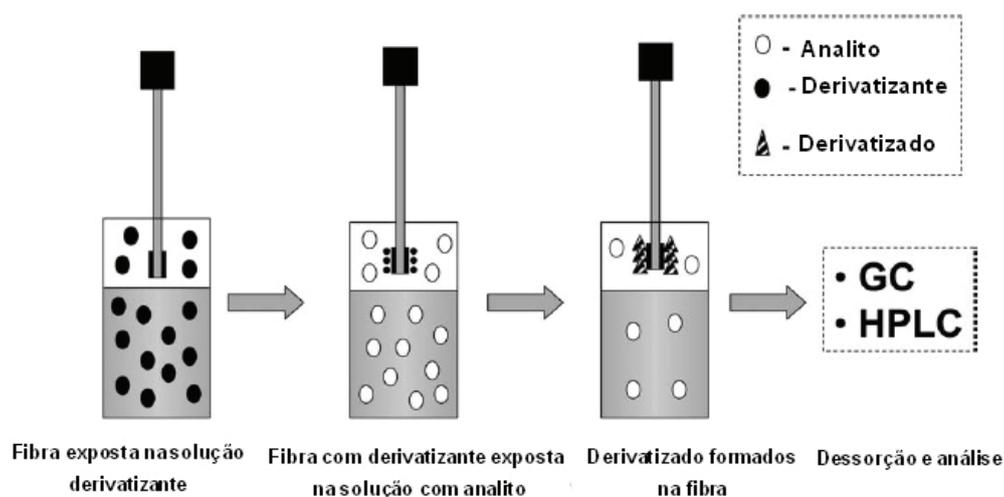


Figura 10: Amostragem e derivatização simultâneas na fibra.

Nas análises de compostos carbonílicos a derivatização na solução é mais utilizada, mas trabalhos recentes têm sido realizados com derivatização na fibra. Saison et al. usaram SPME e GC/MS para determinação de compostos carbonílicos em cerveja utilizando PFBHA como agente derivatizante e fibra de PDMS/DVB para extração. Eles compararam a eficiência de extração com derivatização na solução e derivatização na fibra, mostrando que a derivatização na solução proporcionava maior rendimento de extração dos analitos. [45]

A determinação de compostos carbonílicos em espécies de peixe com e sem derivatização na fibra foi realizada por Jacobo Iglesias [59] e colaboradores. Neste estudo o método de extração por SPME otimizado e validado utilizando a derivatização na fibra, mostrou melhores resultados em termos de sensibilidade e seletividade quando comparado com a mesma extração realizada sem derivatização. [59]

2.9- Geração de Padrões Gasosos.

Para determinar contaminantes/impurezas no ar por SPME em nível de traços é necessário amostras gasosas ou padrões gasosos contendo concentrações conhecidas do analito de interesse. A produção desses padrões

gasosos podem ser classificados como estáticos ou dinâmicos. Os métodos estáticos compreendem os sistemas de recipiente fechado que contém um volume de gás conhecido que recebe uma quantidade conhecida do analito contaminante em estudo. Sua utilização ocorre quando são necessários pequenos volumes com concentrações mais elevadas do contaminante. É de fácil operação, baixo custo e são mais utilizados quando necessita-se trabalhar com pequenos volumes e concentrações não muito baixas do analito de interesse.

Os métodos dinâmicos são sistemas que através do fluxo de gás produz concentrações conhecidas do analito contaminante em misturas. Estes métodos estão diretamente relacionados com a exatidão que se mede o gás diluente e com a exatidão das medidas da quantidade do analito disperso continuamente no gás diluente. Para a produção controlada do contaminante no método dinâmico pode-se utilizar o método da injeção, da permeação, da difusão, da evaporação e das transformações químicas.

No método de injeção gases e líquidos são injetados com velocidade controlada utilizando uma seringa automática ou manual em fluxo contínuo do gás diluente. O método da difusão baseia-se no princípio de que gases e vapores possuem velocidade de difusão constante através do tubo contendo o componente líquido contaminante quando a pressão, geometria do tubo, temperatura e fluxo do gás diluente são constantes.

O método de evaporação baseia-se na saturação de um gás diluente através da passagem deste por um padrão líquido. O gás saturado pelo vapor do líquido é posteriormente diluído para a concentração desejada.

O método de permeação utiliza-se de um tubo de permeação, um instrumento eficaz de calibração para medidas de elementos traços na atmosfera. O tubo de permeação é um tubo pequeno inerte preenchido com composto químico puro para induzir um equilíbrio entre duas fases, gás e líquido (ou sólido) a uma dada temperatura. A espécie de interesse escapa por dissolução ou permeação. A taxa de permeação a qual o analito passa pela membrana plástica obedece a lei de Fick conforme a expressão abaixo:

$$V_p = DS (p_1 - p_2) A/L \quad (\text{equação 1})$$

Onde:

V_p = taxa de permeação

D = coeficiente de difusão

S = constante de solubilidade

p_1 e p_2 = pressão parcial dos dois lados da membrana

A = área superficial da membrana

L = espessura da membrana

O método de permeação é um método versátil, de fácil automação e manuseio podendo ser utilizado para vários componentes, porém requer longo período para início de operação, custo elevado e a necessidade de um sistema adequado para amostragem e contínua emissão do analito pelo tubo.

2.10 - Planejamento Fatorial.

A técnica de planejamento fatorial é um recurso utilizado em estudos que envolvem diferentes variáveis permitindo correlacionar as variáveis independentes com as dependentes através de um número mínimo de ensaios. A metodologia do planejamento fatorial associada à análise de superfície de resposta é uma ferramenta fundamentada na teoria estatística, fornecendo informações confiáveis do processo, minimizando o empirismo que envolve técnicas de tentativa e erro. O planejamento fatorial é realizado com o objetivo de determinar as variáveis experimentais e as interações existentes entre estas variáveis que influenciam significativamente sobre as diferentes respostas de interesse.

Para uma combinação de k fatores quando investigada em dois níveis, o planejamento fatorial consistirá de 2^k experimentos. Os fatores quantitativos

são caracterizados pelos sinais + (mais) para nível mais alto e – (menos) para nível mais baixo. Para fatores qualitativos fica a critério do analista nomear seus níveis. [60]

A fim de obter uma boa estimativa do erro a realização de planejamentos fatoriais com ponto central é desejada. A Figura 11 mostra um planejamento 2^2 com ponto incluído no centro do planejamento. . O ponto central (nível zero) é a média dos níveis das variáveis estudadas. [61]

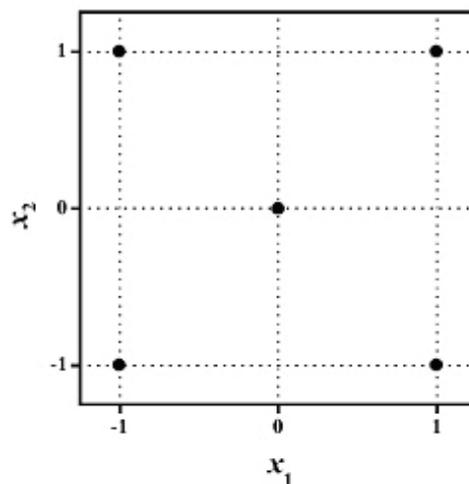


Figura 11: Planejamento 2^2 com ponto central

O experimento com ponto central só é possível ser aplicado para variáveis quantitativas, uma vez que para as variáveis qualitativas não é possível trabalhar com ponto central. [60]

2.11- Parâmetros de mérito

2.11.1- Linearidade.

De acordo com Guia Eurachem, 1998 [62] o estudo da faixa linear indica se o método analítico é capaz de produzir uma resposta diretamente proporcional à concentração do analito na amostra, dentro de uma faixa de aplicação. Os pontos da curva devem ser definidos por no mínimo 6 concentrações mais o

branco. A relação matemática entre a área e concentração do analito é expressa através da equação da reta ou curva analítica, e seu coeficiente de correlação é considerado um ajuste ideal para valores de $R^2 > 0,99$.

Neste estudo a faixa linear de trabalho foi estudada utilizando 6 pontos de concentrações variando entre 1,0 e 18 $\mu\text{g/L}$, foi construído o gráfico contendo as respostas (área do pico) no eixo y e as concentrações correspondentes do analito no eixo x.

2.11.2- Precisão

A precisão é definida como o grau de dispersão dos resultados, obtidos sob condições especificadas, em torno do valor médio podendo ser avaliada em condições de repetibilidade ou reprodutibilidade, sendo expressas em termos de coeficiente de variação ou desvio padrão relativo [63]. Tanto a repetibilidade como a reprodutibilidade são geralmente dependentes da concentração do analito, e assim devem ser determinadas em diferentes valores de concentrações. [64]

Se a mesma amostra é analisada sob condições variadas, a medida de precisão recebe o nome de reprodutibilidade. Esta é definida como sendo o grau de concordância entre os resultados obtidos pela aplicação de um mesmo procedimento analítico, ao mesmo material, sob condições preestabelecidas (como diferentes laboratórios, operadores, equipamentos) podendo ser avaliada parcialmente pela variação de um ou mais fatores. [62]

A repetitividade, também conhecida como precisão intra-ensaio resulta de medições sucessivas da mesma amostra, em diferentes preparações levando em consideração o mesmo procedimento de medição, mesmo observador, mesmo instrumento usado, mesmo local e medições em curto espaço de tempo. A precisão intermediária ou precisão inter-ensaio, avalia a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, podendo ser obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. [65]

O valor máximo aceitável de precisão deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz

e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5%, sendo que em matrizes complexas são aceites valores de até 20%.

Experimentalmente, as medidas de precisão podem ser obtidas realizando-se um mínimo de 10 determinações independentes do analito [62] ou um mínimo de 9 determinações (3 concentrações diferentes / 3 replicadas cada concentração) independentes. [66]

A precisão é expressa como o desvio padrão relativo de uma série de medidas em um mesmo dia (precisão intra-ensaio) e em dias diferentes (precisão inter-ensaio) e calculada através da equação 2:

$$\text{DPR} = s/C_{\text{média}} \times 100 \quad (\text{equação 2})$$

Onde:

DPR = desvio padrão relativo

s = desvio padrão

$C_{\text{média}}$ = concentração média determinada

2.11.3- Limite de detecção.

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob condições experimentais estabelecidas. [62]

O limite de detecção do método desenvolvido é calculado a partir da análise de 10 brancos independentes e calculado conforme equação 3:

$$\text{LD} = \text{valor médio da área do branco} + 3s \quad (\text{equação 3})$$

Onde:

s = desvio padrão da resposta (área do analito)

A área de LD obtida é lançada na curva de calibração para obter o valor da concentração do limite de detecção.

2.11.4- Limite de quantificação.

Limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração do analito em uma matriz que pode ser determinada em níveis considerados aceitáveis de exatidão e precisão sob as condições experimentais estabelecidas. [62]

O limite de quantificação do método desenvolvido é calculado a partir da análise de 10 amostras brancas independentes e calculado conforme equação 4:

$$LQ = \text{valor médio da área do branco} + 10s \quad (\text{equação 4})$$

Onde:

s = desvio padrão da resposta (área do analito)

CAPÍTULO 3: Determinação de acroleína em alimentos

3- OBJETIVO

3.1- *Objetivo geral.*

O objetivo geral deste estudo foi o desenvolvimento de um método para análise de acroleína em alimentos e aplicar a metodologia para quantificar acroleína em amostras de batata, mandioca e linguiça fritas utilizando variados tipos de óleo no processo de fritura destes alimentos.

3.2- *Objetivo específico.*

* Estudo das variáveis mais significativas para desenvolvimento de método de extração por SPME para análise de acroleína em alimentos através de um planejamento fatorial.

* Otimização da metodologia analítica utilizando a técnica de extração micro extração em fase sólida (SPME) após a derivatização com 2,4-DNPH.

* Desenvolver um procedimento analítico para determinação de acroleína por GC/MS.

* Identificar e quantificar acroleína em amostras de batata, mandioca e linguiça fritas.

* Fazer um estudo comparativo da contaminação de acroleína utilizando diferentes tipos de óleo em diferentes etapas de fritura.

3.3 - PARTE EXPERIMENTAL

3.3.1- Reagentes

- Água ultrapura obtida do Milli-Q Millipore (Alemanha)
- Detergente neutro, Extran MA 02 neutro da Merck (RJ, Brasil).
- Hélio N-50 da Air Products (Mogi das Cruzes, Brasil), com 99,999% de pureza.
- Acetonitrila grau HPLC (J.T. Baker, EUA)
- Reagente derivatizante 2,4-DNPH (Merck, Alemanha)
- Cloreto de Sódio, NaCl (Synth).
- Solução de Ácido fosfórico, H_3PO_4 , 85% PA (Synth)
- Solução padrão acroleína-DNPH (Supelco, Brasil)
- Padrões de ácidos graxos metilados SUPELCO37(SUPELCO).

3.3.2- Equipamentos

- Balança analítica com precisão de 0,01 mg, modelo AX200 da Shimadzu (Columbia, USA).
- Estufa Biomatic Aparelhos Científicos Ltda (Porto Alegre, Brasil).
- Chapa aquecedora com controle de temperatura e agitação magnética da IKA RHon(Wilmington,USA).
- Bloco de alumínio 8x6x8cm.
- Termômetro de mercúrio escala -10 a 110°C, resolução 0,5°C.
- Suporte da fibra para SPME Supelco (Bellefonte, USA)
- Fibra Poliacrilato (PA) 85µm, Supelco(Bellefonte, USA)
- Cromatógrafo a Gás HP5890 equipado com detector por ionização de chamas
- Cromatógrafo a Gás – Thermo-Finnigan, acoplada a um detector de espectrometria de massa, MS – Thermo-Finnig, Modelo PolarisQ-Mass spectrometer apresentado na Figura 12.



Figura 12: Sistema de GC/MS (Thermo-Finnigan com detector de espectrometria de massa) contendo um dispositivo SPME inserido no injetor.

3.3.3 – Preparo das soluções.

A solução padrão de acroleína 99,99% foi adquirida na forma derivatizada com 2,4-DNPH. Como não foi possível a compra do padrão puro, foi escolhido trabalhar com o padrão derivatizado ciente de que para realizar as análises nos alimentos seria necessário derivatizar as amostras.

A solução estoque de acroleína-DNPH de concentração igual a $0,504 \pm 0,001$ mg/L foi preparada em água ultrapura a partir da solução padrão. Esta solução foi estocada na geladeira a 6°C até a sua utilização.

Inicialmente para realizar o experimento foi preparada uma solução aquosa com derivatizante (2,4-DNPH) em excesso pesando 0,0375 g de 2,4-DNPH. Esta massa foi adicionada em um balão de 500,0 mL e o volume completado com água ultrapura.

Segundo a norma ABNT/CB-05 (2008) para análise de aldeídos por HPLC a solução derivatizante deve ser preparada diluindo 150,0 mg de 2,4-DNPH

para cada 1000,0 mL de acetonitrila. Para este estudo, após a realização de algumas análises observou-se que 75,0 mg do derivatizante 2,4-DNPH eram suficientes para obter bons resultados decidindo-se assim trabalhar com menor quantidade de derivatizante. O solvente utilizado neste experimento foi a água ultrapura, com adição de 10% m/v de NaCl (efeito *salting out*).

3.3.4- Amostras

As amostras de batata, mandioca, linguiça e dos óleos utilizados foram adquiridos em comércio local na cidade de Belo Horizonte. As batatas foram cortadas em forma de palito e lavadas antes do processo de fritura. Em uma panela inox foi adicionado 400 mL de óleo que foi aquecido até 170 °C. Os alimentos foram adicionados no óleo quente e fritos pelo tempo de 15 min. Entre uma fritura e outra esperou-se o resfriamento completo do óleo.

As massas de batata, mandioca e linguiça utilizadas para a fritura foram de aproximadamente 50,00 g para cada alimento. Para análise por GC/MS a massa dos alimentos utilizada para extração foram de aproximadamente 14,00 g de batata frita e 20,00 g para linguiça e mandioca. Os alimentos foram colocados em um béquer de 500 mL contendo 80,0 mL de solução aquosa 10% m/v de NaCl com excesso de DNPH, 4,0 mL de acetonitrila e o pH foi ajustado para aproximadamente 1,5 com solução de ácido fosfórico 15,0 mol/L. A solução foi agitada por 30 min para que ocorresse a derivatização do analito na solução com o derivatizante 2,4-DNPH. Após os 30 min de agitação, uma alíquota de 17,0 mL de solução foi coletada e transferida para um frasco de vidro de 20,0 mL para extração por SPME com imersão da fibra, seguindo-se o procedimento de extração descrito no item 2.7. Posteriormente as amostras foram analisadas por GC/MS.

3.3.5- Condições cromatográficas para análises dos alimentos.

Foram testadas várias condições cromatográficas para a realização do

experimento. Os parâmetros como temperatura da coluna e tempo de splitless foram alterados até a escolha dos melhores valores para a análise de acroleína-DNPH por GC/MS com coluna apolar.

O método desenvolvido para análise de acroleína por GC/MS teve a temperatura do forno iniciada em 120 °C, mantida por 2 min. Em seguida esta foi aumentada com uma taxa de 10 °C/min até 290 °C permanecendo por 5 min e terminando com um aumento de 10 °C/min até 300 °C permanecendo por 2 min. O tempo total da corrida foi de 27 minutos. O hélio foi utilizado como gás de arraste e o fluxo do gás foi de 1,5 mL/min. A temperatura do injetor foi mantida a 250 °C no modo splitless durante 2 min. A análise foi realizada no modo full scan (faixa de 50–650 m/z) extraindo-se o fragmento de m/z 236.

A coluna utilizada foi uma coluna capilar de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme contendo 5% de difenil, 95% dimetilpolisiloxana (HP-5MS) da *Agilent Technology Inc.*

3.3.6 - Método de Extração por SPME.

Para realizar a extração por SPME a fibra de poliacrilato (85 μm), escolhida para o experimento, foi condicionada por 1 hora a 270 °C conforme indica o manual do fabricante. Após o condicionamento foi feita uma análise do branco da fibra para garantir a ausência de analito. A fibra foi então imersa na solução de acroleína contida no frasco e a solução foi agitada por 10 min sem aquecimento para extração. Após o tempo de extração a fibra foi recolhida e procedeu-se a injeção da amostra no cromatográfico para dessorção durante 2 min, permanecendo mais 3 min no injetor para evitar o aparecimento de “picos fantasmas”.

3.3.7 - Planejamento Fatorial.

Para otimizar alguns parâmetros do método de análise foi realizado um estudo das variáveis consideradas significativas para o experimento. Foi conduzido um planejamento fatorial 2^4 onde foi estudado as seguintes variáveis:

Tabela 4: Variáveis estudadas no planejamento 2⁴

Variáveis	Tempo de extração (A)		Temperatura de extração (B)		Concentração salina (C)		Tempo de dessorção (D)	
	min		°C		%		seg	
Níveis	-	+	-	+	-	+	-	+
	10	40	30	50	0	10	30	120

Os sinais (-) e (+) significam as variáveis em nível mais baixo e nível mais alto respectivamente. O ponto central foi analisado em triplicata com os seguintes valores das variáveis: Tempo de extração: 25 min; Temperatura: 40 °C; Concentração salina: 5 %; Tempo de dessorção: 75 seg.

O objetivo deste estudo foi verificar quais variáveis interferem no processo de extração com relação à sensibilidade do método, avaliando as variáveis principais e suas interações na resposta analítica.

Com este estudo foi possível escolher as melhores condições de trabalho para realização das extrações por SPME.

3.3.8 - Perfil cromatográfico dos ácidos graxos nos óleos.

3.3.8.1 - Preparo da amostra

Hidrólise de lipídeos:

Dissolveu-se em tubo criogênico de capacidade de 2 ml, aproximadamente 10 mg do óleo em 100 µL de uma solução de etanol (95%)/ hidróxido de potássio 1mol/L (5%). Após agitação em vórtex por 10 seg, o óleo foi hidrolisado em um forno de microondas doméstico (Panasonic Piccolo), à potência de 80 W (Potência 2), durante 5 min. Após resfriamento, adicionou-se 400 µl de ácido clorídrico a 20%, uma ponta de espátula de NaCl e 600 µL de acetato de etila. Após agitação em vórtex por 10 seg e repouso por 5 minutos, uma alíquota de

300 µL da camada orgânica foi retirada, colocada em tubos de micro centrífuga e seco por evaporação, obtendo-se assim os ácidos graxos livres.

3.3.8.2 - Metilação dos ácidos graxos.

Os ácidos graxos livres foram metilados com 100,0 µL de solução de BF₃ / metanol (14%) e esta foi aquecida durante 10 minutos em banho de água a 80 °C. Em seguida a solução foi diluída com 400 µL de metanol e analisada por GC/FID.

3.3.8.3 - Condições cromatográficas para análises dos ácidos graxos nos óleos.

As análises de ácidos graxos em diferentes óleos foram realizadas em um cromatógrafo a Gás HP5890 equipado com detector por ionização de chamas. Utilizou-se uma coluna Econocap carbowax (Alltech) com 30 m x 0,32 mm com uma programação de temperatura: início a 120 °C durante 1 minuto, seguida de aquecimento de 7 °C/min até 240 °C. O injetor foi operado no modo split (de 1/50) a 250 °C e detector FID a 250°C. Hidrogênio foi utilizado como gás de arraste no fluxo de 2 mL/min e o volume de injeção foi de 1,0 µL. A identificação dos picos foi feita por comparação com padrões de ácidos graxos metilados SUPELCO37.

3.4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.4.1- Planejamento fatorial 2⁴

A Tabela 5 mostra os dados da matriz de contraste construída para a realização do planejamento 2⁴ para obter as melhores condições de tempo, temperatura de extração, concentração salina e tempo de dessorção. As análises foram realizadas com triplicata do ponto central.

Tabela 5: Fatores do planejamento fatorial 2⁴, com 19 experimentos

Ensaio	Variáveis				Valores da variáveis				Resposta
	t (min) ¹	T(°C) ²	[NaCl] ³ (%)	t _{dessorção} ⁴ (seg)	A ¹	B ²	C ³	D ⁴	Área
1	-	-	-	-	10	30	0	30	147031
2	+	-	-	-	40	30	0	30	182491
3	-	+	-	-	10	50	0	30	83758
4	+	+	-	-	40	50	0	30	377271
5	-	-	+	-	10	30	10	30	127198
6	+	-	+	-	40	30	10	30	331730
7	-	+	+	-	10	50	10	30	202974
8	+	+	+	-	40	50	10	30	1141357
9	-	-	-	+	10	30	0	120	14344
10	+	-	-	+	40	30	0	120	72734
11	-	+	-	+	10	50	0	120	268907
12	+	+	-	+	40	50	0	120	849109
13	-	-	+	+	10	30	10	120	340398
14	+	-	+	+	40	30	10	120	1494969
15	-	+	+	+	10	50	10	120	414637
16	+	+	+	+	40	50	10	120	1328477
17	0	0	0	0	25	40	5	75	976436
18	0	0	0	0	25	40	5	75	893759
19	0	0	0	0	25	40	5	75	1035348

- 1- Tempo de extração;
- 2- Temperatura de extração;
- 3- Concentração de cloreto de sódio;
- 4- Tempo de dessorção.

O gráfico de Pareto foi construído para verificar as variáveis e os efeitos mais significativos para o método estudado ao nível de 95% de confiança.

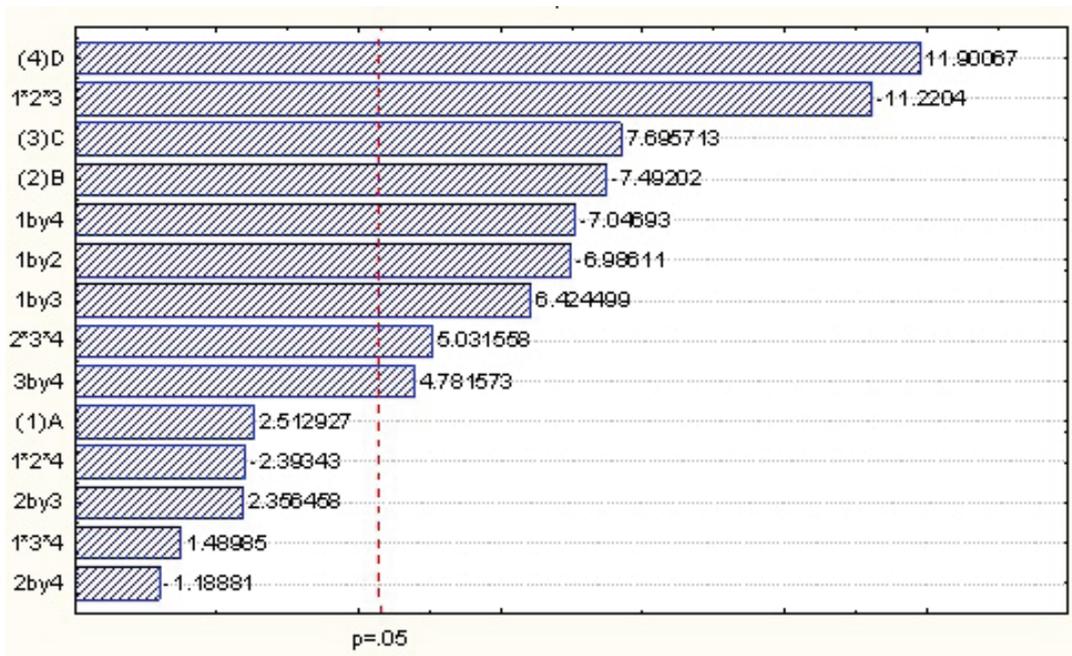


Figura 13: Gráfico de Pareto estudo na otimização (A) tempo de extração, (B) temperatura de extração, (C) concentração salina, (D) tempo de dessorção

Analisando as variáveis independentes observa-se que as variáveis temperatura de extração (B), concentração salina (C) e tempo de dessorção (D) foram significativas, porém o tempo de extração (A) não apresentou uma resposta significativa, pois a faixa horizontal não ultrapassou a linha de 95% de confiança. Neste estudo a temperatura de extração (B) e a concentração salina (C) tem resposta mais significativas para menor valor de temperatura e

maior valor de concentração respectivamente. O tempo de dessorção (D) foi significativo para valores mais altos.

Para o estudo das interações de duas variáveis, a interação entre o tempo de extração e o tempo de dessorção (1 by 4) bem como o tempo de extração e a temperatura de extração (1 by 2) foram significativas ao nível mais baixo, indicando que se deve trabalhar em faixas mais próximas dos menores valores escolhidos no planejamento. O contrário ocorreu com as interações tempo de extração e concentração salina (1 by 3) e, concentração salina com tempo de dessorção (3 by 4). Estas interações apresentaram significância para níveis mais altos, ou seja, a faixa ótima de trabalho deve estar próxima dos valores mais altos testados pelo planejamento, isto é, 40 min para o tempo de extração, concentração salina em torno de 10% e tempo de dessorção de 120 seg. A interação entre temperatura de extração e concentração salina mostrou-se insignificante ao nível de 95% de confiança.

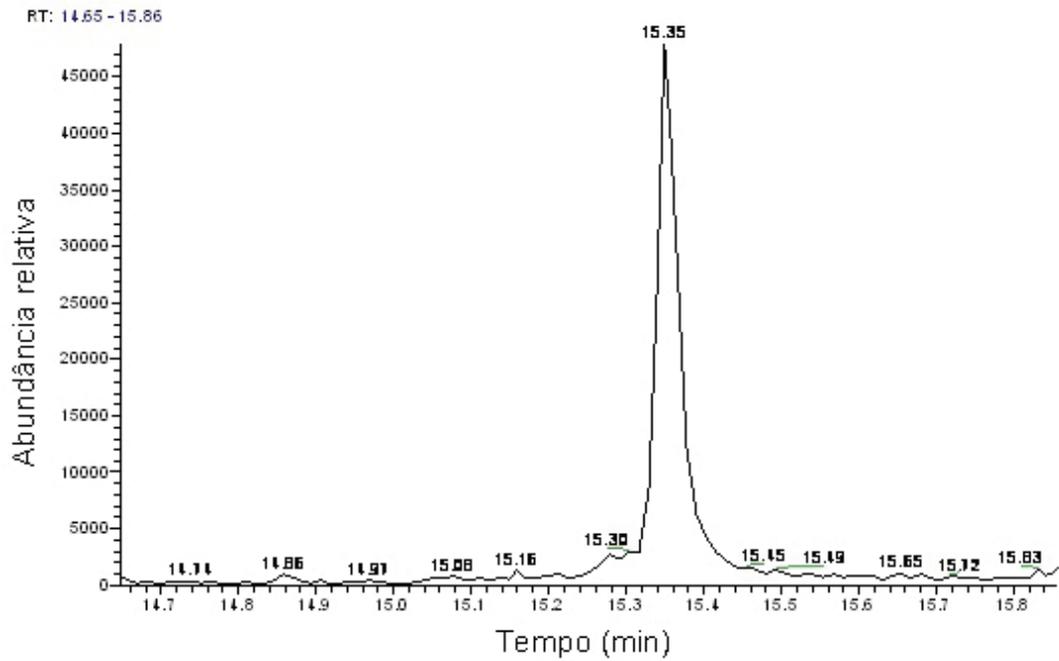
A interação de três variáveis, tempo de extração, temperatura de extração e concentração salina (1*2*3) foi significativa tendendo para melhores resultados com valores mais baixos em torno de 10 min, 30 °C e 0% m/v de solução salina. Para a interação entre temperatura de extração, concentração salina e tempo de dessorção (2*3*4) os valores mostraram-se significativos para valores mais altos, 50 °C, 10% m/v de NaCl e 120 seg de dessorção respectivamente. As interações que apresentaram insignificância foram: tempo de extração com temperatura de extração e, tempo de dessorção (1*2*4) e tempo de extração com concentração salina e tempo de dessorção (1*3*4).

Considerando os resultados obtidos escolheu-se trabalhar com menor tempo de extração, 10 min, para obtenção de análises mais rápidas. As variáveis, tempo de dessorção e concentração salina foram significativas para níveis mais altos escolhendo-se trabalhar com o tempo de dessorção de 120 seg e concentração salina da solução de 10% m/v. A temperatura de extração foi significativa para o nível mais baixo, isto é, a temperatura ambiente.

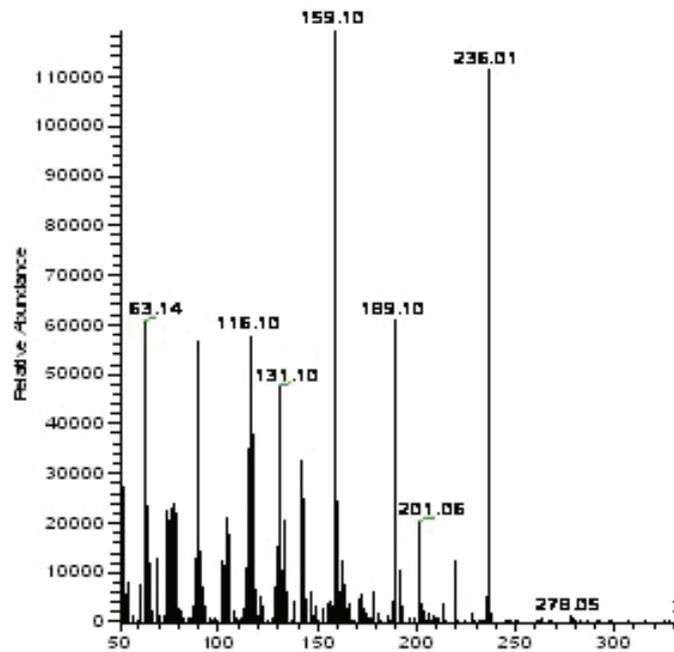
3.4.2 - Obtenção do cromatograma e espectro de massas da acroleína.

A Figura 14 mostra o cromatograma de íons selecionado (a) e o espectro de massas (b) obtido para a acroleína-DNPH por GC/MS após extração por SPME nas condições otimizadas descritas no item 3.2.5

O tempo de retenção para o pico da acroleína foi de 15,35 min. Para o experimento realizado, não foi possível a comparação do espectro da acroleína-DNPH com o banco de dados de espectro de massa contido na biblioteca NIST (*National Institute of Standards and Technology*) do equipamento, pois na biblioteca só foi encontrado o espectro da acroleína pura e a acroleína utilizada no experimento foi um padrão derivatizado com 2,4-DNPH.



(a)



(b)

Figura 14: Cromatograma de íon selecionado de m/z 236 (a) e espectro de massas (b) do padrão acroleína-DNPH por GC/MS.

Porém, comparando-se com a literatura, o espectro obtido neste trabalho é similar ao espectro encontrado por Lane, R. H., Smathers, J. L. [38], (Figura 15). Neste estudo monitorou-se a produção de aldeídos durante a fritura utilizando a técnica de cromatografia líquida em fase reversa com confirmação dos compostos obtidos por GC/MS.

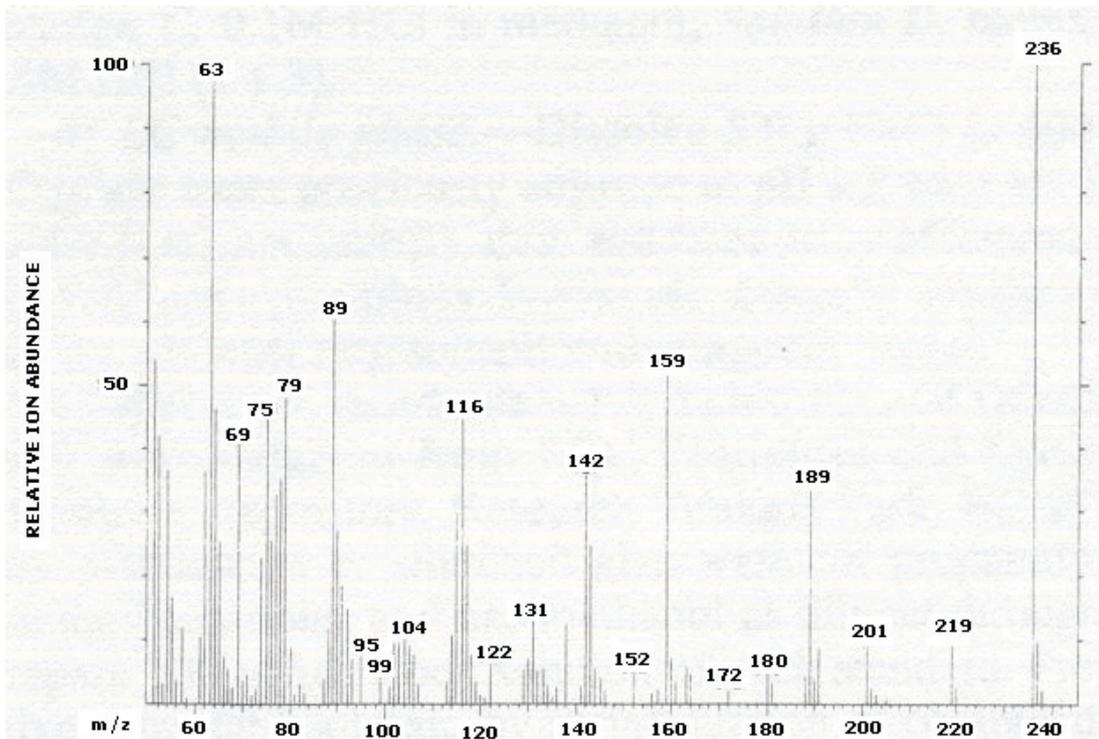


Figura 15: Espectro de massa para acroleína-DNPH

O tempo de retenção e o espectro de massas encontrado para o padrão de acroleína-DNPH serviram para identificar o composto e determinar o analito nas análises realizadas nos alimentos fritos.

3.4.3 - Parâmetros de Mérito.

Alguns parâmetros de mérito como linearidade, precisão, limite de detecção e limite de quantificação foram avaliados para certificar a qualidade analítica dos resultados gerados pelo método desenvolvido neste trabalho.

3.4.3.1- Curva Analítica de calibração.

A curva de calibração para a acroleína-DNPH foi obtida para seis níveis de concentração, com triplicata para cada nível. As concentrações analisadas foram 1,009; 4,037; 7,065, 10,093; 14,13 e 18,167 µg/L com tempo de extração de 10 minutos.

A Figura 16 apresenta a curva analítica ($y = 7407x - 317,19$) da acroleína-DNPH obtida. O coeficiente de correlação encontrado para o método desenvolvido foi maior que 0,994.

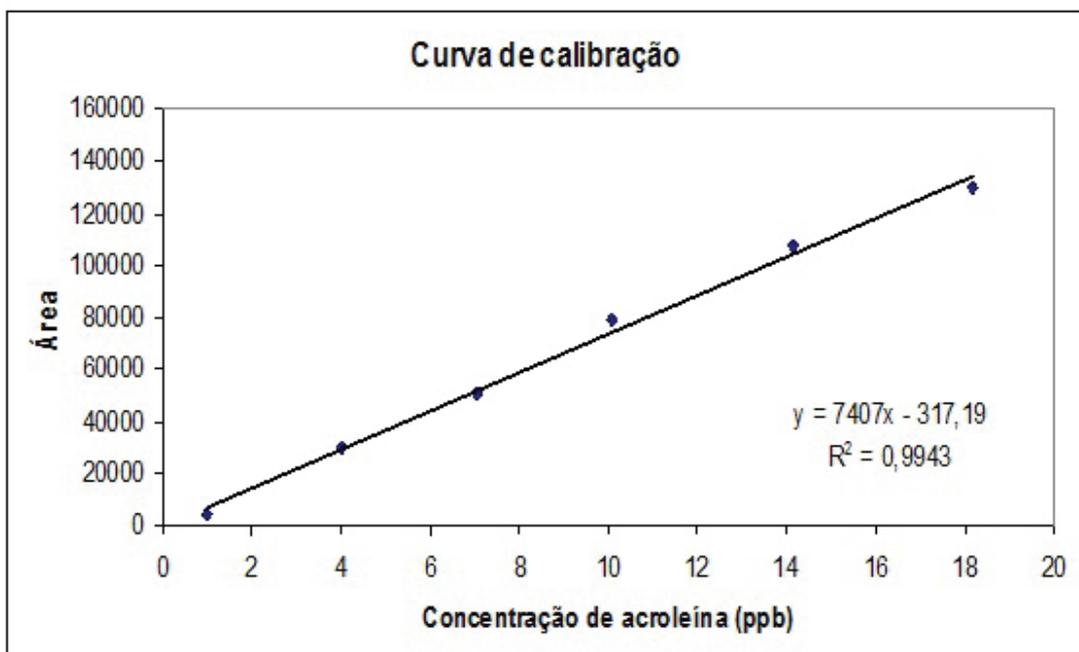


Figura 16: Curva de calibração para solução de acroleína-DNPH com amostragem por SPME e análise por GC/MS.

A linearidade foi também avaliada através dos valores de $F_{\text{calculado}} (F_c)$ e $F_{\text{tabelado}} (F_t)$ obtidos da curva de calibração. Para que a curva seja linear o valor de F_c deve ser no mínimo dez vezes maior que o valor de F_t . [60]

O F_c foi calculado conforme a expressão abaixo:

$$F_c = MQ_R / MQ_r$$

Onde:

MQ_R = média quadrática devida a regressão

MQ_r = média quadrática residual

Os valores de F_c , F_t , MQ_R e MQ_r foram calculados pelo software Origin 8.0 e estão apresentados na Tabela 5:

Tabela 6: Resultado da análise de variância da curva analítica.

<i>Analito</i>	MQ_R	MQ_r	F_c	F_t
Acroleína	5297,56675	12,59693	420,54438	3,33944E ⁻⁵

Com os valores apresentados acima, observa-se que o método apresentou boa linearidade, pois o valor de F_c foi em torno de 103 vezes o valor de F_t .

A heteroscedasticidade das variâncias também foi confirmada pelo teste F no nível de confiança de 95%. Para o cálculo das equações de regressão foi necessário utilizar o método dos mínimos quadrados ponderado (MMQP) pelas variâncias das respostas instrumentais. [67]. O software Origin 8.0 foi utilizado para reproduzir a curva e o valor encontrado de R^2 foi de 0,9988.

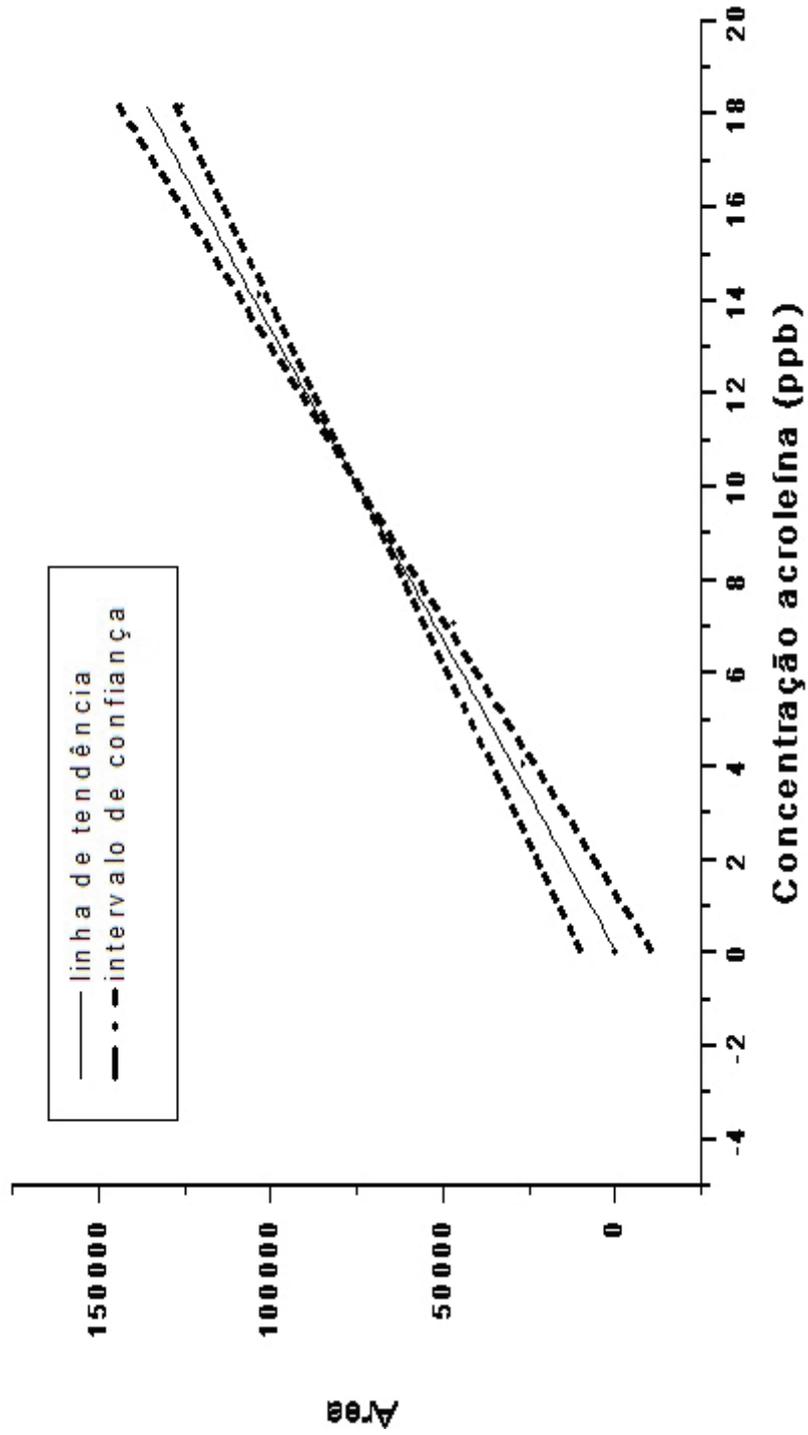


Figura 17: Curva de calibração para acroleína-DNPH em solução com amostragem por SPME.

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados a partir de 10 medidas consecutivas do branco, através das equações 3 e 4 respectivamente descritas no item 2.11 conforme recomendado pelo Guia Eurachem [62]. O LD determinado foi 0,43 ng/g, e o LQ encontrado foi 1,40 ng/g.

A precisão do método foi avaliada através de teste de repetibilidade que representa a concordância entre medidas sucessivas de um mesmo método, realizada sob as mesmas condições com várias medições da mesma amostra. Para análise da precisão intra ensaio foram analisadas 10 replicatas de concentração 9,08 µg/L. O coeficiente de variação (CV) encontrado foi de 9,72%. Para avaliar a precisão intermediária 5 replicatas de concentração de 9,08 µg/L foram analisadas em dias diferentes. O valor de CV encontrado foi de 9,55%.

A Tabela 7 apresenta alguns trabalhos e os valores de R², LD e RSD para quantificação de acroleína em diversas matrizes de alimentos.

Tabela 7: Valores de LD, RSD e R² para análise de acroleína em matrizes de alimento.

Matriz	Técnica de extração	R ²	LD (µg/L)	RSD (%)	Autor
Cerveja	SPME	0,9970	0,24	5,09	[45]
Água bidestilada e água de chuva	SPME	0,9980	0,10	12,8 e 14,0 %	[69]
Vodka	SPME	0,9986	0,05	●	[70]
Vodka	SPME	0,9799	●	5,5	[44]
Cidras	●	0,9989	●	●	[71]

- Valores não informados pelos autores

Considerando a matriz estudada, uma matriz complexa devido à dificuldade de extrair acroleína do alimento conclui-se que o valor encontrado para CV é aceitável por ser menor que 20%.

3.4.4 - Aplicação do método analítico GC/MS proposto para determinação de acroleína em batata frita.

Para se conseguir o procedimento de reação de derivatização na solução, vários procedimentos foram testados. Inicialmente testou-se colocar um pedaço (aproximadamente 1,5 cm) de batata frita no frasco com a solução derivatizante para exposição da fibra por imersão. Este procedimento possibilitou a análise da acroleína, porém observou-se que o método não apresentava uma extração com boa repetibilidade não obtendo cromatogramas com picos de áreas similares ou até mesmo não obtendo resposta. A conclusão para esta não repetibilidade do método era que a batata se despedaçava na solução derivatizante formando uma solução heterogênea. Os pedaços interferiam na absorção do analito pela fibra ocasionando o erro nas análises, causando muitas vezes entupimento do septo do injetor, contaminação do liner e a perda de fibras. O mesmo resultado foi observado ao se colocar a solução derivatizante e a batata em centrífuga ou no banho ultrassom, portanto essas possibilidades de trabalho foram descartadas.

Foi necessário obter a derivatização do analito na solução derivatizante (2,4-DNPH, água ultrapura, acetonitrila) a partir de uma solução homogênea. Assim decidiu-se utilizar batatas inteiras, trabalhando-se com a mesma massa de batata frita para todas as análises e um volume maior de solução derivatizante, para que as batatas flutuassem sobre a solução não sendo dissolvidas durante a agitação. Dessa forma os resultados encontrados foram quantitativos e repetitivos entre as amostras analisadas.

A massa de batata também foi um parâmetro testado para a determinação da condição ótima de extração. Primeiramente uma massa de 8,00 g foi testada. Porém, para esta massa de batata a área do pico de acroleína encontrava-se

abaixo do limite de quantificação da curva de calibração. Com isso tornou-se necessário aumentar a massa de batata frita analisada, escolhendo-se trabalhar com 14,00 g de batata frita.

Utilizando-se o método otimizado foram analisados batatas fritas em cinco tipos de óleos em 4 etapas de fritura fazendo triplicata das análises. A Tabela 8 e Figura 18 mostram os valores médios da concentração de acroleína em batata frita em óleo de soja, girassol, canola, milho e dendê em quatro etapas da reutilização de cada óleo conforme descrito no item 3.2.4.

Tabela 8: Valores médios de concentração de acroleína em batata frita.

Frituras	Concentração de acroleína (ng/g)				
	Soja	Canola	Girassol	Milho	Dendê
1ª fritura	2,99	4,19	3,4	4,52	2,03
2ª fritura	1,23	1,97	2,8	4,85	2,00
3ª fritura	0,87	4,47	2,78	4,71	1,08
4ª fritura	0,68	4,3	4,00	2,25	2,06
Média	1,44	3,73	3,25	4,08	1,93

Os resultados das análises de acroleína em batata frita no óleo de soja apresentaram uma média de concentração de 1,44 ng/g com variação de 0,68 a 2,99 ng/g. Os resultados mostram que a concentração de acroleína diminuiu significativamente com a reutilização do óleo de soja conforme indicado na Figura 18.

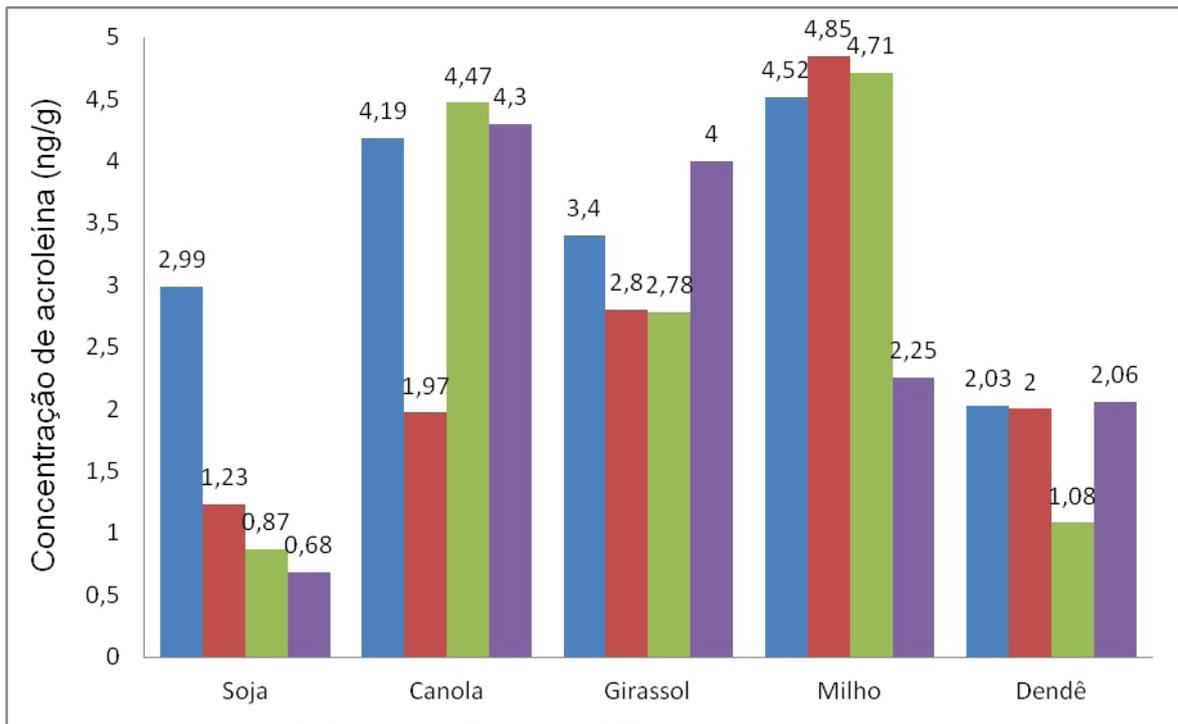


Figura 18: Concentração de acroleína durante a reutilização dos óleos.

De acordo com a literatura, a absorção do óleo pelo alimento varia de 10% a 60% dependendo de uma série de fatores que atuam na velocidade de transferência de massa e de energia entre o óleo e o alimento [71]. Bouchon, 2003 [72], sugere que a absorção do óleo pelo alimento depende da quantidade de água removida durante a fritura e que a maior absorção do óleo ocorre na etapa em que o alimento é retirado da fritura. A absorção do óleo é um fenômeno de superfície que envolve um equilíbrio entre adesão e drenagem do óleo após a remoção do alimento do óleo.

Jorge et al. [73] em seu trabalho analisou o comportamento dos óleos de girassol, soja e milho em frituras de batata e concluiu que o óleo de soja apresentou menor absorção pelas batatas diferindo dos óleos de girassol e milho. Este trabalho concluiu que as batatas absorveram uma quantidade menor de óleo de soja do que os óleos de girassol e milho. De acordo com o autor o óleo de soja tem uma maior quantidade de ácidos graxos saturados, o que diminui a absorção através do alimento [74]. Estes fatores podem ter contribuído para os valores encontrados neste estudo, uma vez que a absorção de uma quantidade

menor de óleo pode afetar a quantidade de acroleína retida nos alimentos.

A concentração média de acroleína encontrada para as batatas fritas em óleo de girassol foi de 3,25 ng/g, variando entre 2,78 - 4,00 ng/g. Uma concentração média de 4,08 ng/g, com um intervalo 2,25 - 4,85 ng/g foi observada para as batatas fritas em óleo de milho, e a média de 3,73 ng/g, variando entre 1,97 - 4,47 ng/g foram obtidas para as batatas frita em óleo de canola.

Para o óleo de girassol, o óleo de canola e o óleo de milho, a concentração de acroleína permaneceu quase constante para as batatas fritas nos três tipos de óleo durante os quatro ciclos de fritura. No entanto, um aumento significativo na concentração de acroleína ocorreu no último processo de fritura para o óleo de girassol, enquanto ocorreu uma diminuição da concentração de acroleína na segunda e quarta etapa de fritura no óleo de canola e óleo de milho, respectivamente. A concentração de acroleína foi maior nas batatas fritas nos três tipos de óleo acima mencionados do que quando utilizado o óleo de soja.

A Tabela 9 apresenta a composição em teor de ácidos graxos para os óleos de girassol, canola, milho, soja e dendê. Pode-se observar que a concentração de ácidos graxos insaturados presentes nos três primeiros óleos é maior do que no óleo de soja. Este fator de acordo com [73] conduz à absorção de uma maior quantidade de óleo pelo alimento. Este fato explica porque as concentrações de acroleína encontrados em batatas fritas nos óleos de girassol, canola e milho são maiores que as encontradas em batatas fritas em óleo de soja.

Tabela 9: Teor de ácidos graxos e viscosidade dos óleos por GC/FID.

Ácidos Graxos (%)	Girassol	Soja	Milho	Canola	Dendê
C12:0 (láurico)	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0
C14:0 (mirístico)	0,0	0,2	0,0	0,0	0,4
C16:0 (palmítico)	6,8	10,8	11,6	5,6	25,1
C16:1 (palmitolênico)	0,0	0,3	0,0	0,3	0,0
C18:0 (esteárico)	4,6	4,3	3,3	3,7	6,1
C18:1 (oleico)	28,1	22,1	34,7	56,7	36,7
C18:2 (linoleico)	58,7	53,7	47,9	23,3	28,1
C18:3 (linolênico)	0,5	7,1	1,6	8,5	2,6
C20:0 (arquídico)	1,1	1,4	0,9	2,0	1,0
TOTAL (%)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Ác. Graxos Saturados (total %)	12,7	16,8	15,8	11,2	32,5
Ác. Graxos Insaturados (total %)	87,3	83,2	84,2	88,8	67,5
Viscosidade (CP)	50	53,6	56,4	65,1	99,5

O teor de ácidos graxos insaturados é maior no óleo de girassol (87%) do que no óleo de milho (84%), como é mostrado na Tabela 9. Porém não justifica a maior concentração de acroleína, em batatas fritas em óleo de milho o que talvez possa ser explicado por outro parâmetro como a variação da temperatura que pode interferir no processo de absorção do óleo pelo alimento. A variação da temperatura durante o processo de fritura pode ter afetado os resultados obtidos para estes dois tipos de óleo uma vez que foi observada uma queda na temperatura do óleo ao adicionar o alimento no óleo quente devido à perda de água do alimento.

Em um estudo realizado por Pozo-Díez [75], a absorção do óleo pelo alimento não estava diretamente relacionada com o número de vezes em que o óleo foi reutilizado, mas era afetada pelas mudanças de temperatura durante o processo de fritura.

Os resultados obtidos neste trabalho estão em concordância com o trabalho realizado por Pozo-Diez [75]. Pequenas variações de temperatura foram observadas durante os experimentos, o que pode explicar a flutuação na concentração de acroleína observadas em batatas fritas com óleos de canola, milho e dendê.

A Figura 19 mostra as variações nas concentrações de acroleína durante a reutilização dos óleos no processo de fritura da batata.

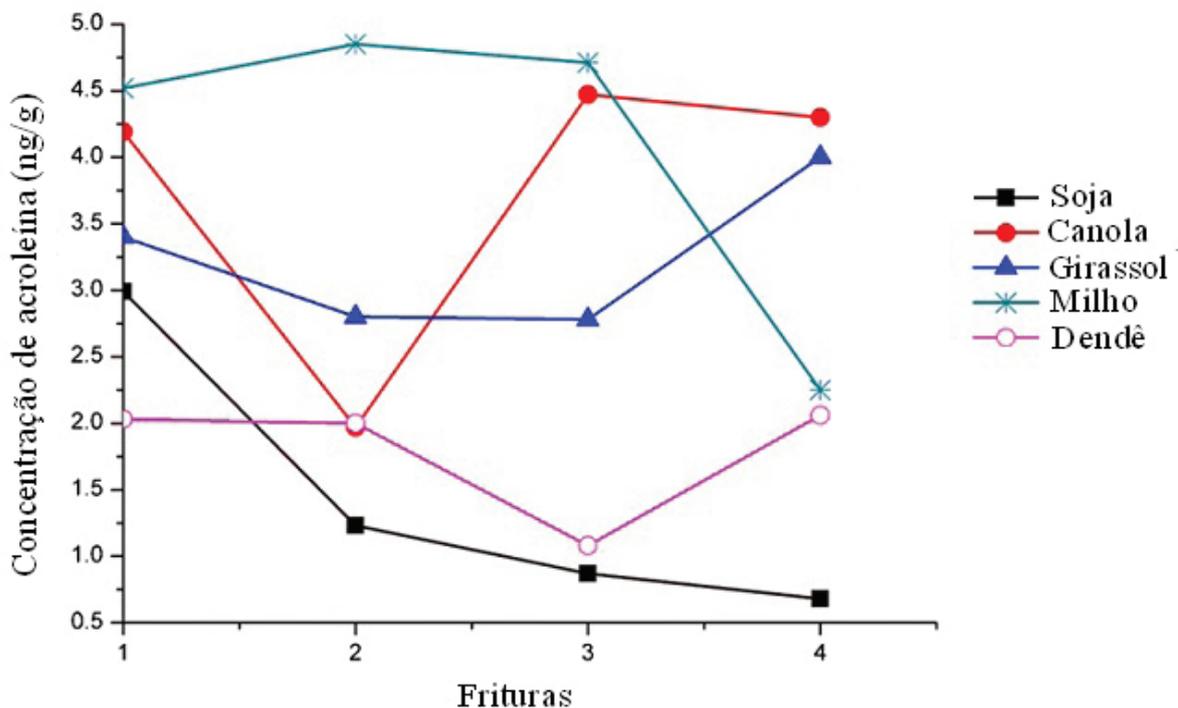


Figura 19: Concentração de acroleína em batata frita

Finalmente, os resultados para a análise de acroleína em batatas fritas em óleo de dendê apresentaram uma concentração média de 1,93 ng/g, com variação de 1,08 - 2,06 ng/g. A concentração de acroleína foi semelhante ao longo de quase todos os ciclos de fritura. O que poderia justificar as diferentes concentrações de acroleína encontradas é o mesmo que o referido acima para os outros óleos, isto é, as alterações de temperatura durante o processo de fritura podem ter sido relevantes para causar uma alteração na absorção de óleo de dendê pela batata.

As batatas fritas em óleo de dendê apresentaram concentrações mais

baixas de acroleína após o primeiro ciclo de fritura (Figura 19). De acordo com Paul e Mittal [76], vários fatores afetam a penetração do óleo no alimento, sendo um deles a viscosidade do óleo de fritura. O óleo de dendê possui maior viscosidade entre os óleos estudados. A concentração de acroleína detectada durante o primeiro ciclo de fritura com o óleo de dendê foi menos do que nos outros óleos. Isto pode ser explicado pela alta viscosidade do óleo de dendê em relação aos demais óleos. Este fator pode ter contribuído para o fato de que as batatas fritas em óleo de dendê apresentem uma menor concentração de acroleína durante o primeiro ciclo de fritura.

Thalita O. S. [77] propôs em seu trabalho o mecanismo de formação de acroleína pela oxidação do ácido linolênico conforme mostrado na Figura 20. Em seu trabalho a autora concluiu que a emissão de acroleína em óleo de soja é maior que em óleo de dendê, pois o óleo de soja é mais rico em ácidos graxos poliinsaturados. Porém, este comportamento não foi observado neste experimento durante a reutilização dos óleos de soja e dendê.

O ponto de ebulição da acroleína é de 53 °C, portanto, pode-se considerar que parte da acroleína foi perdida para o ambiente durante o processo de fritura realizado a 170 °C como esta perda por evaporação não é homogênea, ela pode ter ocasionado a variação encontrada nos resultados dos alimentos analisados.

Batatas comerciais também foram adquiridas para análise de acroleína sendo elas: batata palito comprada em praça de alimentação de shopping, batata palha e batata chips (salgadinhos). O método desenvolvido também detectou acroleína nas batatas comerciais e os valores são apresentados na Figura 21.

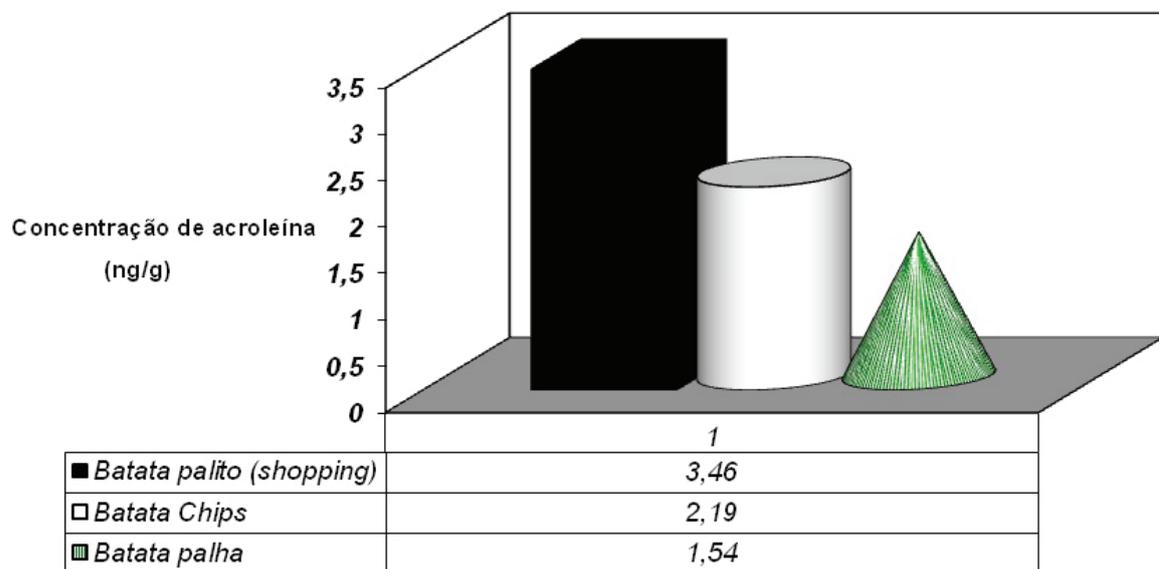


Figura 21: Análise de acroleína em batatas fritas comerciais.

As concentrações de acroleína presentes na batata palha e batata chips foram muito menores do que as observadas nas batatas fritas a palito. Esta diferença pode ser explicada pela diferença na relação superfície/volume entre as batatas, sendo muito mais elevado para batata frita a palito do que para batata palha e batata chips. De acordo com Paul e Mittal [76], a relação superfície/volume, ou seja, a distância do centro à superfície dos alimentos de alimento em contato com o óleo de fritura é um fator importante que contribui para a determinação da quantidade de óleo absorvida pelos alimentos.

Pode-se concluir que devido sua menor relação superfície/volume e

também por possuir menor massa a absorção do óleo pela batata chips e pela batata palha é menor, quando comparada com a batata a palito obtendo menor concentração de acroleína no alimento.

3.4.5 - Aplicação do método GC/MS proposto para análise de acroleína em mandioca e linguiça frita.

O método desenvolvido para análise da acroleína extraída da batata frita foi aplicado em outros dois alimentos, mandioca e linguiça também utilizando diferentes tipos de óleo e somente uma etapa de fritura para o processo de fritura. Este trabalho foi realizado com o objetivo de verificar se o comportamento da variação de acroleína com o tipo de óleo utilizado na fritura seria o mesmo encontrado no estudo realizado com batata frita. Os alimentos foram preparados e a acroleína extraída do alimento conforme descrito no item 3.2.5. Os resultados da concentração de acroleína em mandioca e linguiça frita encontram-se na Figura 22.

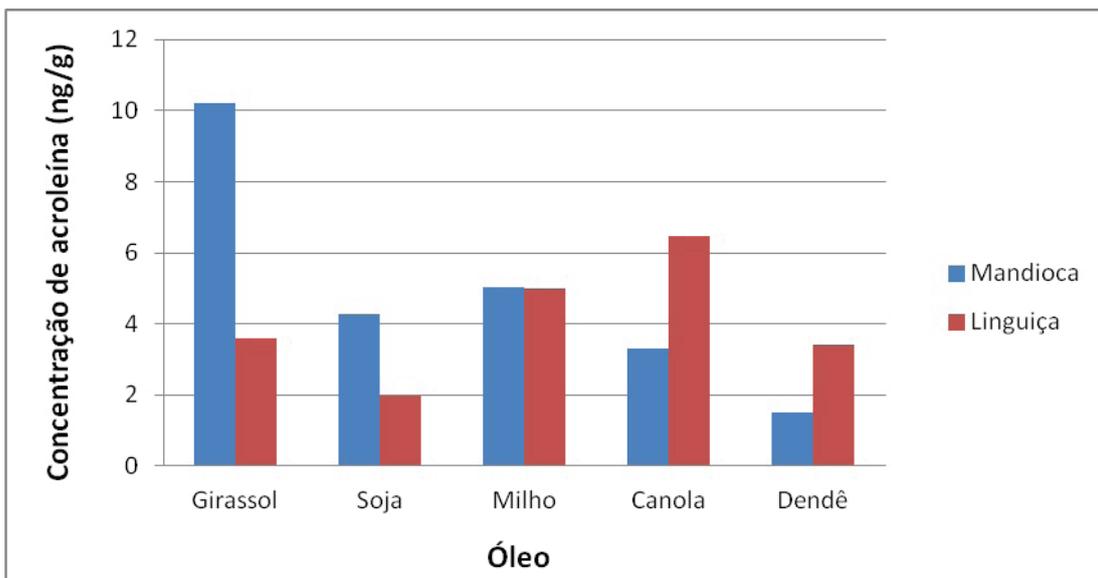


Figura 22: Análise de acroleína em mandioca e linguiça frita.

Como mostrado na Figura 22, a concentração de acroleína foi menor na linguiça quando comparado com a mandioca utilizando os óleos de girassol e soja. Este resultado pode ser explicado devido a linguiça apresentar uma tensão interfacial maior do que a mandioca, uma vez que a linguiça é revestida com uma pele. Em produtos formulados como a linguiça, a permeabilidade da camada exterior do produto, depende da espessura da pele externa ao alimento, o que determina a resistência estrutural para a vaporização da água. Uma estrutura mais forte e mais elástica pode resultar em uma camada exterior que pode atuar como uma barreira eficaz contra a absorção de óleo [78]. Uma vez que os óleos de girassol e soja têm uma baixa viscosidade, eles têm uma maior dificuldade em quebrar a tensão interfacial da linguiça, assim, a concentração de acroleína neste alimento foi menor. Em contraste, a concentração de acroleína na linguiça foi maior do que na mandioca quando os óleos mais densos, canola e dendê, foram utilizados para fritar.

A maior concentração de acroleína encontrada na linguiça foi observada nas amostras fritas em óleo de canola, que tem o menor teor de ácidos graxos saturados, concluindo que este óleo foi mais extensivamente absorvido pelo alimento. Por outro lado, a mandioca preparada em óleo de dendê, que tem um maior teor de ácidos graxos saturados, apresentou a mais baixa concentração de acroleína. Assim, a absorção de óleo de dendê por mandioca foi menor, e este fato resultou em menor grau de retenção de acroleína em amostras fritas. De acordo com (Damy, 2003) [74] o aumento do teor de ácidos graxos saturado do óleo interfere na absorção do óleo por alimentos, ou seja, alimentos fritos em óleos mais saturados têm um menor grau de absorção.

As concentrações de acroleína encontradas em ambos os alimentos mandioca e linguiça, em óleo de milho foram muito próximas. Além disso, o trabalho descrito anteriormente mostrou que a concentração de acroleína em batatas fritas em óleo de milho é semelhante aos resultados obtidos neste estudo. Isto sugere que o óleo de milho tem uma absorção homogênea independente do alimento estudado.

Estes resultados de quantificação de acroleína em alimentos diferentes mostram que a contaminação do alimento pela acroleína causada pela queima

do óleo varia de acordo com o alimento e não está diretamente ligada com teor de ácidos graxos, viscosidade do óleo ou absorção do óleo pelo alimento.

O processo de fritura envolve vários fatores como transferência de massa representada principalmente pela perda de água do alimento, absorção do óleo e transferência de calor, fatores que não foram avaliados neste estudo. Em temperaturas variando entre 150 – 200 °C e devido à presença de oxigênio o óleo sofre uma série de reações de decomposição formando uma variedade de compostos carbonílicos [79]. A composição do óleo fresco é diferente da composição de óleos reutilizados.

De acordo com alguns autores ([25] [73-75]) inúmeras características podem afetar a estabilidade do óleo de fritura, como por exemplo: tipo de óleo, tipo e quantidade e composição do alimento, modelo da fritadeira, teor de água, tempo de fritura, flutuações de temperatura, teor de sal e uso de aditivos. Este estudo mostra que estes fatores são de grande importância para quantificação de acroleína, uma vez que alimentos diferentes apresentaram valores diferentes de acroleína encontrada.

3.4.6 – Conclusão.

Este estudo mostrou o desenvolvimento de um método de quantificação e método de amostragem por microextração em fase sólida com derivatização na solução para análise de acroleína em alimentos. O método de extração desenvolvido é simples, rápido e de baixo custo. A validação da técnica de quantificação desenvolvida apresentou bons resultados de linearidade, limite de detecção e limite de quantificação e precisão, podendo ser aplicado para análise de traço de acroleína em diferentes alimentos. Com este trabalho observa-se a necessidade de posteriores estudos buscando associar novas variáveis do processo de fritura tais como variação do teor de ácidos graxos durante a reutilização dos óleos, perda de água pelo alimento para maiores conclusões.

CAPÍTULO 4: Análise de acroleína no ar ambiente e ar expirado

4- OBJETIVO

4.1 - *Objetivo geral*

Desenvolvimento de método de extração com derivatização na fibra para quantificar acroleína em ar ambiente e ar expirado de indivíduos fumantes e de indivíduos não fumantes.

4.2 - *Objetivo específico*

* Otimização da metodologia analítica para determinação de acroleína utilizando microextração em fase sólida após derivatização na fibra com 2,4-DNPH.

* Otimização do método de análise de acroleína pela técnica de cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas.

* Identificar e quantificar acroleína em ar de diferentes ambientes, no ar expirado de indivíduos fumantes e ar expirado de indivíduos não fumantes.

4.3 - PARTE EXPERIMENTAL

4.3.1- Reagentes.

- Água ultra-pura obtida do Ultrapurificador de água Purelab – Elga;
- Detergente neutro, Extran MA 02 neutro da Merck (RJ, Brasil);
- Hélio N-50 da Air Products (Mogi das Cruzes, Brasil), com 99,999% de pureza;
- Acetonitrila grau HPLC (J.T. Baker, EUA);
- Reagente derivatizante 2,4-DNPH (Merck, Alemanha);
- Cloreto de Sódio, NaCl (Synth);
- Solução de Ácido fosfórico, H_3PO_4 , 85% PA (Synth);
- Solução padrão de acroleína-DNPH (Supelco, Brasil);
- Tubo de permeação, VICI Metronics Inc. (Washington, EUA), certificado com rastreabilidade até os padrões do NIST (National Institute of Standards and Technologies), comprimento de 3,5 cm e taxa de permeação 326,25 ng min⁻¹ a 30 °C.

4.3.2 – Equipamentos

- Balança analítica resolução 0,01mg, modelo AX200 da Shimadzu (Columbia, USA);
- Chapa aquecedora com controle de temperatura e agitação magnética da IKA RHon (Wilmington, USA);
- Bloco de alumínio 8x6x8cm;
- Termômetro de mercúrio escala -10 a 110°C, resolução 0,5°C;
- Suporte da fibra para SPME Supelco (Bellefonte, USA);
- Fibra Poliacrilato (PA) 85µm, Supelco (Bellefonte, USA);
- Medidor de fluxo digital Flowmeter Optiflow 650 (Supelco Inc., EUA)

resolução 0,01 L/min;

- Cromatógrafo GC – Thermo-Finnigan, acoplada a um detector de espectrometria de massa, MS – Thermo-Finnig, Modelo PolarisQ-Mass spectrometer. (Figura 12)

4.4 - Sistema Cromatográfico

O método desenvolvido para a determinação de acroleína por GC/MS em ar ambiente e ar expirado foi o mesmo utilizado para análise em alimentos. A temperatura do forno foi iniciada em 120 °C, mantida por 2 min. Em seguida esta foi aumentada a uma taxa de 10 °C/min até 290 °C permanecendo por 5 min e terminando com um aumento de 10 °C/min até 300 °C permanecendo por 2 min. O tempo total da corrida foi de 27 min. O hélio foi utilizado como gás de arraste sendo o fluxo do gás de 1,5 mL/min. A temperatura do injetor foi mantida a 250 °C no modo splitless durante 2 min. O espectrômetro de massas operou no modo positivo, impacto de elétrons (EI) ou com energia de 70 eV, com fonte de íons a 200 °C e a interface GC/MS a 250 °C. A análise foi realizada no modo full scan (faixa de 50–650 m/z) extraíndo o fragmento de m/z 236.

4.5 - Sistema de Geração de Padrões Gasosos.

Para a construção da curva de calibração foi utilizado um sistema de gerador de padrão gasoso conforme mostrado na Figura 23. O ar ambiente comprimido a 345 kPa era conduzido a um purificador UHP-10ZA da marca Domnick Hunter e passava por um tubo espiralado de cobre (diâmetro = 0,3 cm) para pré aquecimento. Após passar pela válvula de controle de diluição, o ar entrava na câmara de permeação onde estava o tubo de permeação de material polimérico contendo acroleína líquida. O tubo de permeação foi submetido a um fluxo constante com temperatura controlada por um termostato a $30,0 \pm 0,1$ °C.

O sistema de controle de temperatura era conectado a uma resistência e a um ventilador para distribuição uniforme do calor dentro da câmara de permeação. A Figura 23 mostra um fluxograma do sistema de geração de vapores gasosos e a Figura 24 apresenta uma foto do sistema utilizado neste trabalho.

A coleta de amostras do sistema de geração de padrão gasoso foi efetuada através da técnica de microextração em fase sólida fazendo-se a derivatização com 2,4-DNPH na fibra PA de 85 µm.

A fibra foi inicialmente condicionada a 280 °C por uma hora e em seguida imersa por 5 minutos em uma solução derivatizante (2,4-DNPH) de concentração 0,13 mg/mL e pH aproximado de 1,5. A extração do padrão gasoso de acroleína foi realizada através da exposição da fibra no bulbo de amostragem da câmara de permeação por um período de 15 min. Este período de amostragem é estabelecido quando se pretende determinar o limite de exposição em curto prazo (*Short Time Exposition Limit – STEL*). Para análise de ar expirado, trabalhou-se com a amostragem de 25 seg, tempo em que os voluntários se sentiram mais confortáveis para amostragem.

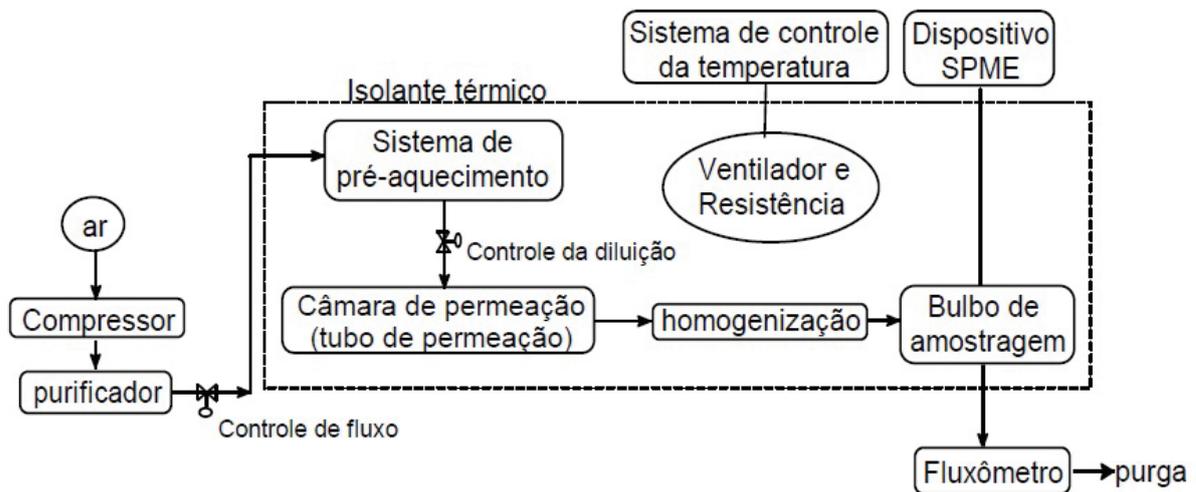


Figura 23: Fluxograma do sistema de geração de vapores pelo método de permeação.

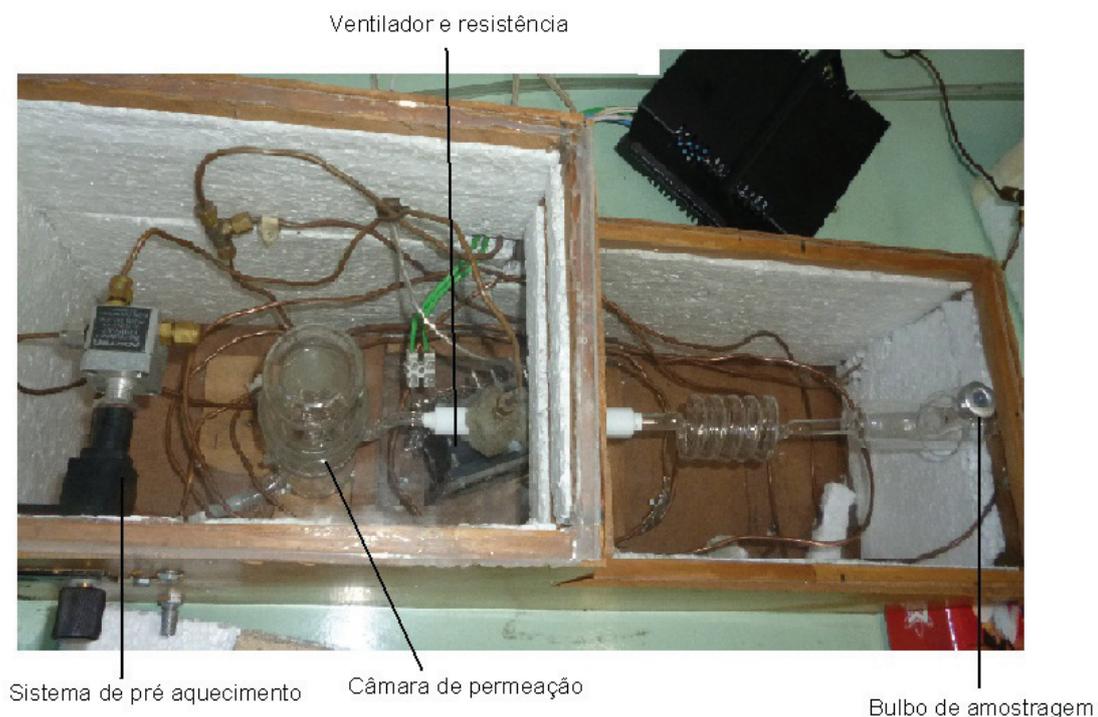


Figura 24: Sistema de gerador de vapores gasosos disponível no Departamento de Química - UFMG.

4.6 - Coleta das amostras de ar expirado e ar ambiente

A amostragem do ar ambiente foi realizada no período de janeiro a fevereiro de 2012 com temperatura média de $24 \pm 1^\circ\text{C}$, em Belo Horizonte, Minas Gerais.

O ar ambiente foi coletado para análise em pontos internos e externos. Os pontos em ambientes internos onde o ar ambiente foi coletado foram: 3 laboratórios situados no primeiro andar do Departamento de Química, 2 cozinhas de lanchonetes localizadas no Departamento de Química e outra no Colégio Técnico (COLTEC) e os pontos externos: 3 estacionamentos abertos (estacionamento do Departamento de Química, ICEX e da Escola de Engenharia) e 2 regiões arborizadas (regiões sem fluxo de carro), sendo um atrás do restaurante universitário e outro atrás do Departamento de Química. Após cada coleta, a fibra foi recolhida e acondicionada em uma caixa de isopor contendo gelo até o momento da análise. Para que não ocorresse perda do

analito o período máximo entre a coleta da amostra e a análise não ultrapassou 20 minutos.

Grote & Pawliszyn [80] desenvolveram um procedimento para amostragem do ar expirado que consiste na expiração direta na fibra de SPME que é inserida em um tubo de teflon. O tubo de teflon, mostrado na Figura 25, foi confeccionado para esse fim e adaptado a um bocal descartável de papelão para evitar o contato da boca com o tubo de teflon.

A coleta do ar expirado foi realizada da seguinte forma: o indivíduo inspirou o ar liberando uma pequena porção (por aproximadamente 3 seg) e depois expirou durante 25 segundos na fibra de SPME inserida em um tubo de teflon conforme mostra a Figura 25.



Figura 25: Amostrador para coleta de ar expirado.

Logo após a coleta a fibra foi inserida no injetor do sistema GC/MS para análise. Para este estudo foram realizadas análises de ar expirado de indivíduos fumantes e indivíduos não fumantes ambos estudantes e funcionários do Departamento de Química da UFMG. As análises realizadas no ar expirado de indivíduos não fumantes contou com um grupo composto por 5 mulheres e 4 homens. O grupo de indivíduos fumantes totalizou 7 indivíduos todos alocados no Departamento de Química.

Os parâmetros como idade, sexo, não foram levados em consideração nos resultados deste estudo, uma vez que o objetivo foi comparar a contaminação de acroleína em indivíduos fumantes e não fumantes.

4.7 – Derivatização na fibra por Microextração em Fase Sólida

O objetivo deste estudo foi verificar quais variáveis seriam melhores no processo de extração com derivatização na fibra com relação à sensibilidade do método, avaliando as variáveis principais e suas interações na resposta analítica.

Vários testes foram realizados para aperfeiçoar a melhor condição de derivatização na fibra. Temperatura de extração, concentração do derivatizante e tempo de extração foram as variáveis estudadas. A derivatização na fibra pode ocorrer no modo headspace ou por imersão. Alguns autores trabalharam com derivatização na fibra no modo headspace.

Foram feitos testes de derivatização na fibra no modo headspace e por imersão na solução derivatizante. As análises realizadas com derivatização na fibra por imersão na solução derivatizante apresentaram melhores resultados de área, sendo escolhida como método de derivatização das amostras de ar neste trabalho.

A derivatização na fibra PA por imersão consistiu em expor a fibra em solução em um frasco de vidro sob agitação, contendo 17 mL da solução derivatizante (água, NaCl (10% m/v) e DNPH) em pH aproximado de 1,5. Após 15 min a fibra foi recolhida e exposta por headspace em 5,0 mL de solução de acroleína 1,0 mg/L, a temperatura ambiente e sob agitação por 15 min para que ocorresse a derivatização do analito de interesse na fibra.

Para otimizar alguns parâmetros do método de extração com derivatização na fibra foi realizado um estudo das variáveis consideradas significativas para o experimento. Foi conduzido um planejamento fatorial 2³ estudando as variáveis conforme apresentado na Tabela 10.

Tabela 10: Variáveis estudadas no planejamento 2³.

Variáveis	Tempo de extração (A) - min		Temperatura de extração (B) - °C		Concentração de derivatizante (C) - mg/mL	
	-	+	-	+	-	+
Níveis	5	15	63	97	0,02	0,13

Os sinais (-) e (+) significam as variáveis em nível mais baixo e nível mais alto respectivamente. O ponto central foi analisado em triplicata com os seguintes valores das variáveis: Tempo de extração: 10 min; Temperatura: 80 °C; Concentração do derivatizante: 0,075 mg/mL.

4.8 - Estudo de parâmetros de mérito

Para a construção da curva de calibração a fibra foi mergulhada em uma solução aquosa contendo NaCl (10% m/v) e DNPH (0,13 mg/mL) durante 15 minutos para ser saturada com o agente derivatizante. Em seguida, a fibra foi inserida na câmara de permeação para a extração do analito por 15 min. As diferentes concentrações de acroleína usadas para a construção da curva de calibração foram obtidas através da variação do fluxo de ar na câmara de permeação. O tempo de absorção/exposição da fibra de SPME na câmara foi de 15 minutos. O tubo de permeação foi mantido a temperatura de $30,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ sob um fluxo constante do gás diluente (ar comprimido).

A concentração de acroleína de acordo com o fluxo do gás diluente foi calculada conforme a equação:

$$C = (P \times K)/F \quad (\text{equação 5})$$

Onde:

C = concentração do gás

P = taxa de permeação (ng/min)

K = constante molar (RT/ massa molar do gás)

F = fluxo do gás diluente (mL/min)

Para cada nível de concentração do analito foram feitas triplicatas das medidas de fluxo do gás diluente e das extrações por SPME. A curva construída

para análise de ar expirado foi a mesma utilizada para quantificação de acroleína no ar ambiente.

Para o cálculo do *LD* e *LQ* as análises do branco o tubo de permeação foi retirado da câmara de permeação permitindo a passagem do fluxo de ar diluente por 24 horas antes de efetuar as extrações. Foram realizadas 10 análises do branco e os limites de detecção e quantificação calculados conforme equação 3 e 4 descritas no item 2.11. Para análise da precisão intraensaio foram analisadas 10 replicatas de concentração 120,7 µg/m³ no mesmo dia e para avaliar a precisão intermediária, 5 replicatas de concentração de 120,7 µg/m³ foram analisadas em dias diferentes.

4.9 - RESULTADOS E DISCUSSÕES.

4.9.1- Planejamento fatorial 2³

Com este estudo foi possível escolher as melhores condições de derivatização da amostra na fibra PA para realização das análises das amostras reais.

A Tabela 11 mostra os dados da matriz de contraste construída para a realização do planejamento 2³ a fim de se obter as melhores condições de extração com derivatização na fibra por imersão na solução derivatizante. As análises foram realizadas com triplicata do ponto central.

Tabela 11: Fatores do planejamento fatorial 2^3 , com 11 experimentos.

Experimento	Variáveis			Resposta
	Tempo de extração	Temperatura de extração	Concentração do derivatizante	
1	+	+	-	558579
2	-	+	-	1057126
3	+	-	-	332967
4	-	-	-	161725
5	+	+	+	951772
6	-	+	+	641831
7	+	-	+	1178207
8	-	-	+	1200427
9	0	0	0	466735
10	0	0	0	578489
11	0	0	0	167907

1- Tempo de extração: 5 min (-) e 15 min (+)

2- Temperatura de extração: 63 °C (-) e 97 °C (+)

3- Concentração de derivatizante: 0,02 mg/mL (-) e 0,13 mg/mL (+)

O gráfico de Pareto mostrado na Figura 26 foi construído para verificar as variáveis e os efeitos mais significativos para o método desenvolvido ao nível de 95% de confiança.

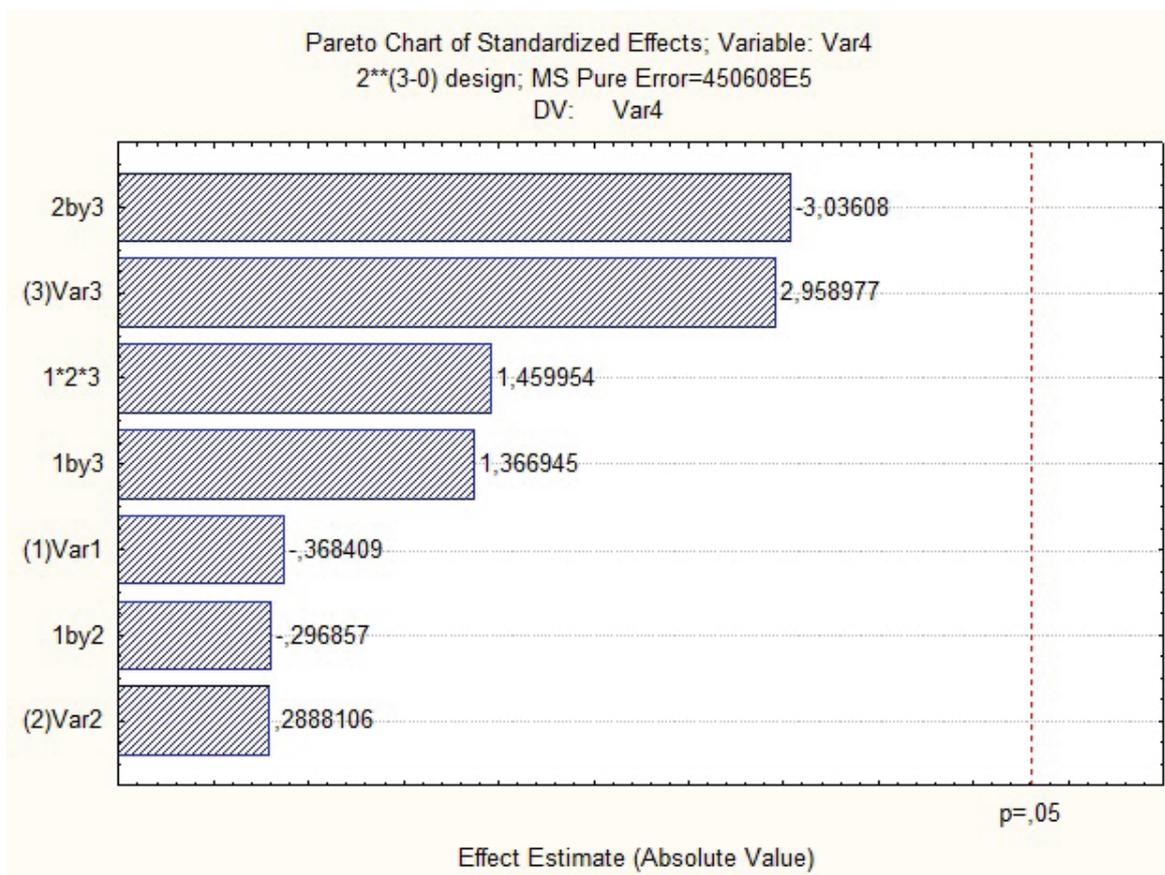


Figura 26: Gráfico de pareto para otimização de derivatização na fibra.

Observa-se pelo Gráfico de Pareto que nenhuma das variáveis estudadas foram significativas ao nível de confiança de 95%. A escolha das variáveis se deu pelos valores de área conforme descrito na Tabela 11. Observa-se que as maiores áreas foram obtidas nos pontos 2, 7 e 8 que correspondem a extrações com maior valor da concentração de derivatizante (0,13 mg/mL), menor tempo de extração (5 min) e menor temperatura (63 °C).

4.9.2 - Validação da metodologia

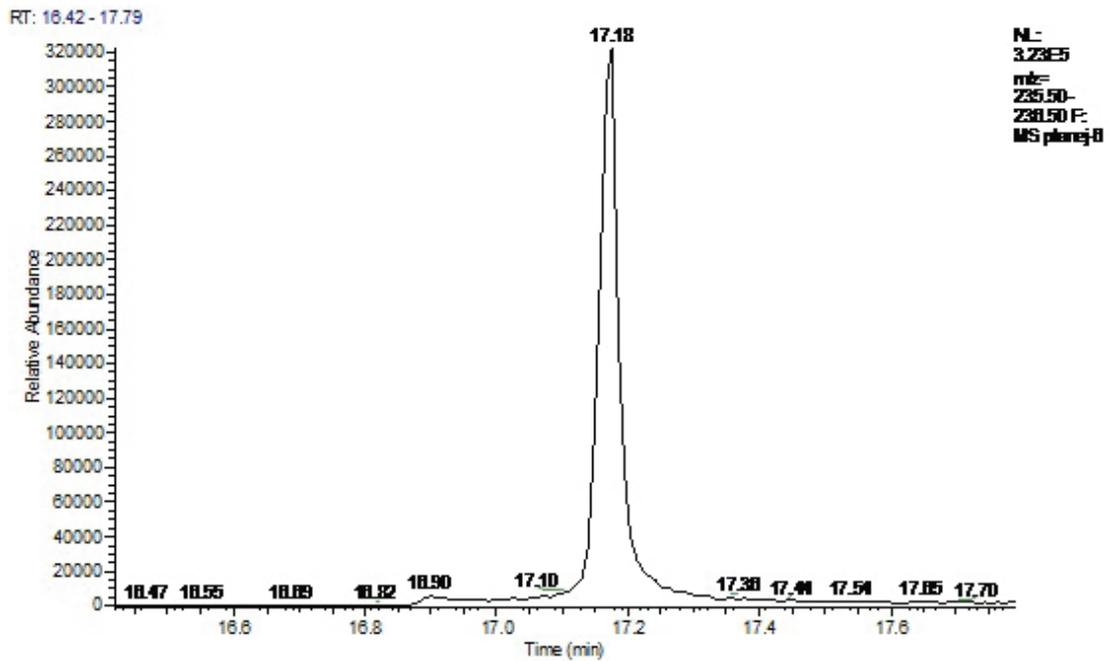
Os parâmetros de mérito linearidade, precisão, limite de detecção e limite de quantificação foram estudados para avaliar a qualidade analítica dos

resultados gerados pelo método desenvolvido neste trabalho.

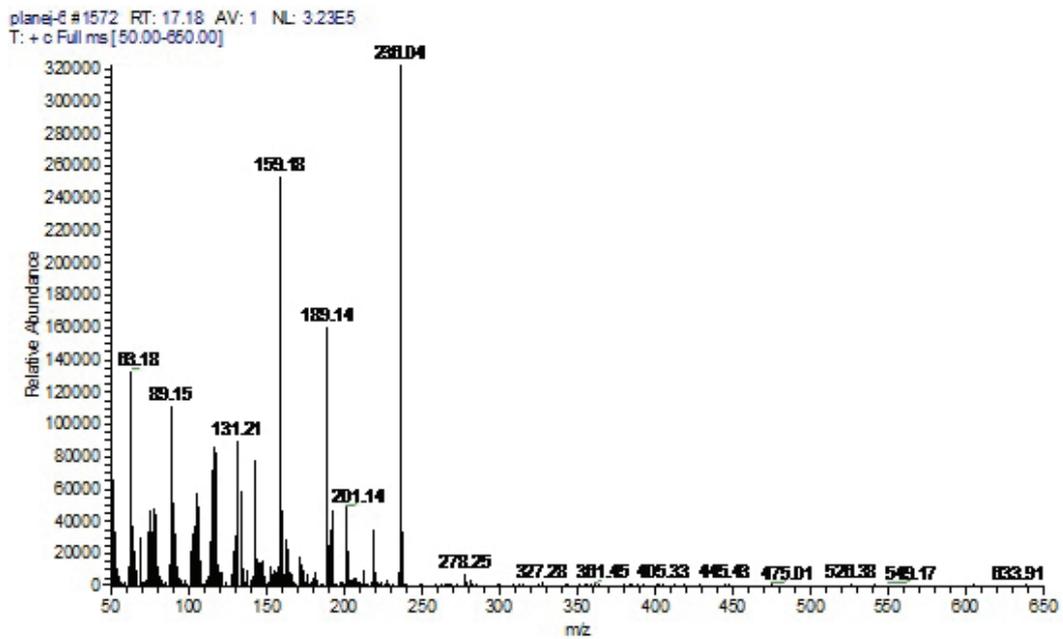
A Figura 27 mostra o cromatograma e o espectro de massas, obtidos nas condições de derivatização e extração descritas no item 4.7.

A curva de calibração pelo método de permeação foi feita em cinco níveis de concentração, com triplicata para cada nível. As concentrações obtidas a partir da variação do fluxo na câmara de permeação com extração de 15 min foram: 94,110; 116,86; 141,92; 165,42; 205,10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. O tempo de retenção para o pico de acroleína foi de 17,18 minutos e a similaridade entre o espectro de massas obtido era o mesmo obtido pelo padrão do analito derivatizado em solução.

CAPÍTULO 4: Análise de acroleína no ar ambiente e ar expirado



(a)



(b)

Figura 27: Cromatograma totais de íons (a) e espectro de massas (b) para análise de acroleína-DNPH com derivatização na fibra.

A Figura 28 apresenta a curva analítica ($y = 978,78x + 2616,2$) da acroleína-DNPH obtida após derivatização na fibra. O coeficiente de determinação encontrado para o método desenvolvido foi de 0,993.

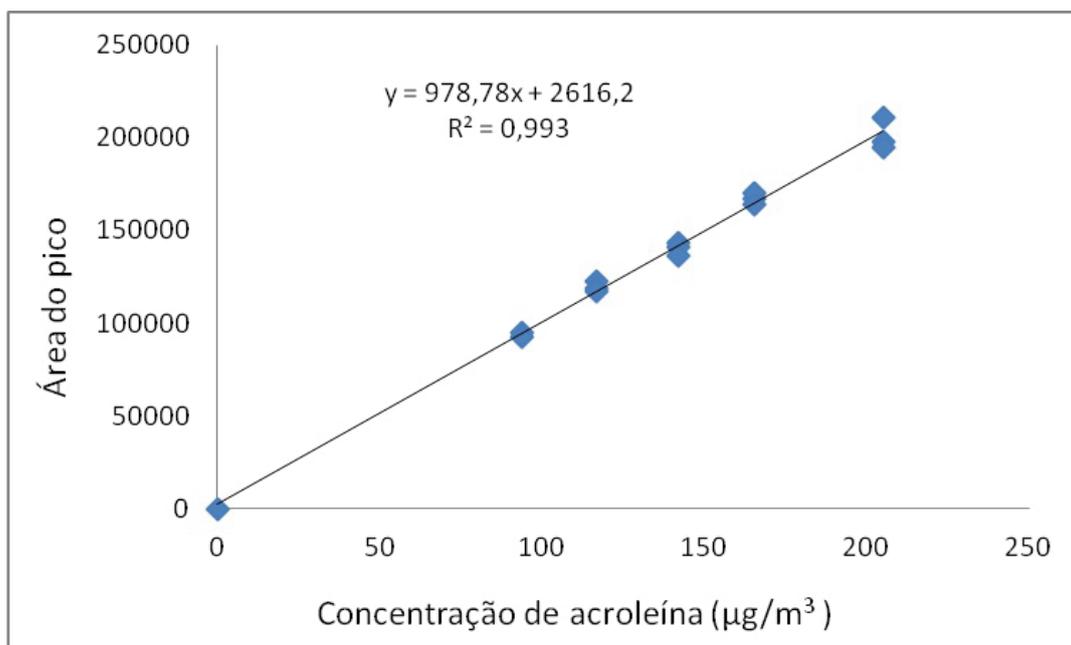


Figura 28: Curva de calibração para solução de acroleína-DNPH com amostragem por SPME e análise por GC/MS.

A análise da homocedasticidade e heterocedasticidade dos resultados foi realizada pelo Teste Brown-Forsythe's. O teste confirmou que os valores são homocedásticos ao nível de confiança de 95%.

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados a partir de 10 medidas consecutivas do branco, através das equações 3 e 4 respectivamente conforme recomendado pelo Guia Eurachem. Para a análise de LD e LQ o tubo de permeação foi retirado da câmara de permeação deixando-se o ar diluente passar pela câmara por um período de 48 horas para garantir a retirada de todo o analito do sistema. Após este período o ar diluente foi coletado e analisado. O LD determinado foi $16,7 \mu\text{g}/\text{m}^3$, e o LQ foi $40,1 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Os resultados encontrados estão altos quando comparados com a literatura ([36],

[81]). Não foi possível trabalhar com concentrações menores, pois a câmara de permeação não suporta um fluxo de gás diluente maior.

Jason, et. al [82] desenvolveram um método para análise de acroleína em ar ambiente utilizando dansilhidrazina (DNSH) como agente derivatizante e análise feita por HPLC. O método proposto apresentou limite de detecção de 0,24 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ para a amostragem ativa de 30 minutos utilizando cartucho C18 para derivatização da amostra. As coletas do ar foram realizadas no interior de apartamentos e a concentração de acroleína variou de 2,76 a 4,53 $\mu\text{g}/\text{m}^3$.

A precisão do método foi avaliada através de teste de repetibilidade que representa a concordância entre medidas sucessivas de um mesmo método, realizada sob as mesmas condições com várias medições da mesma amostra.

Para análise da precisão intraensaio foram analisadas 10 replicatas de concentração 120,7 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. O coeficiente de variação (CV) (%) encontrado foi de 7,1%. Para avaliar a precisão intermediária, 5 replicatas de concentração de 120,7 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ foram analisadas em dias diferentes. O valor de CV encontrado foi de 10,1%. Considerando a matriz complexa, conclui-se que este valor é aceitável pois é bem menor que 20%.

4.9.3 - Análise de acroleína no ar expirado de fumantes e não fumantes.

O método otimizado de extração de acroleína com derivatização na fibra e análise por GC/MS foi aplicado em amostras reais de ar expirado de indivíduos fumantes e não fumantes conforme descrito no item 4.6. A análise de ar expirado de indivíduos não fumantes apresentou uma média de 38,62 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ com variação de 19,48 a 80,56 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ enquanto que para indivíduos fumantes a média foi de 59,83 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, variando de 26,85 a 91,22 $\mu\text{g}/\text{m}^3$.

Na Tabela 12 está representada as concentrações ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) obtidas para todas as amostras e a Figura 29 apresenta as distribuições destes resultados.

Tabela 12: Concentração ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) de acroleína em ar expirado de indivíduos fumantes e não fumantes.

Indivíduos	Não Fumantes ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Fumantes ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)
1	43,64	91,22
2	19,48	60,50
3	25,29	76,02
4	23,56	62,20
5	80,56	26,85
6	48,77	58,33
7	23,26	43,70
8	51,13	•
9	31,93	•

• amostras não analisadas

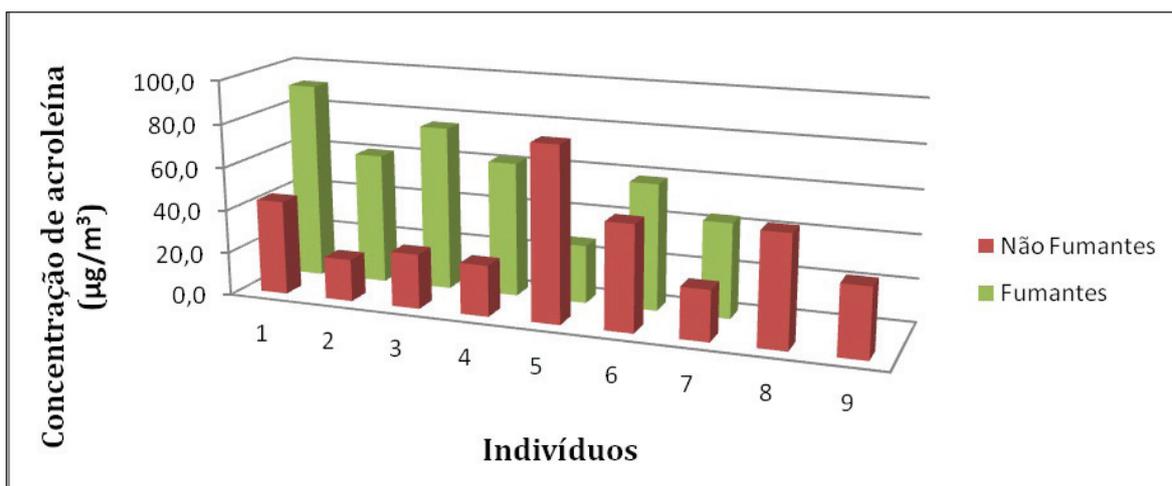


Figura 29: Concentração de acroleína em ar expirado de indivíduos fumantes e não fumantes.

Observa-se pela Figura 29 que a concentração de acroleína no ar expirado dos indivíduos fumantes analisados foram em média mais elevadas. Estudando estes resultados verificou-se que o tempo em que o indivíduo tinha fumado até o momento de análise do ar expirado foi um fator que tinha que ser levado em consideração. As análises do ar expirado de indivíduos que haviam fumado no prazo máximo de 30 minutos antes da coleta de ar, apresentaram maiores valores de concentração de acroleína. A média da concentração de acroleína no ar expirado de indivíduos não fumantes foi menor.

Os resultados mostram que mesmo no ar expirado dos indivíduos não fumantes a concentração encontrada foi bastante elevada. Um fator considerado relevante para esse estudo foi observado que para os indivíduos em que o ar expirado foi coletado após almoço a concentração de acroleína foi maior do que para os indivíduos onde o ar expirado foi coletado antes da refeição principal (almoço). Os indivíduos relataram o consumo de carne frita, ou outro alimento gorduroso e estes alimentos podem ter contribuído para aumentar o teor de acroleína encontrado. A alta concentração de acroleína no ar expirado do indivíduo não fumante número 5 (Figura 29) pode ser atribuída a exposição deste indivíduo através da manipulação da acroleína durante a execução deste trabalho.

Não foram encontrados trabalhos de quantificação de compostos carbonílicos em ar expirado de indivíduos apesar de serem compostos de alto poder carcinogênico, irritantes de mucosas e terem relação com mal de Alzheimer.[83]

Gilbert, et. al, [6] determinaram a concentração de acroleína em residências e concluíram que em residências com fumantes a concentração de acroleína ($2,29 \mu\text{g}/\text{m}^3$) foi maior que a concentração em residências que não apresentavam indivíduos fumantes ($0,91 \mu\text{g}/\text{m}^3$).

O teste estatístico ANOVA foi aplicado aos resultados de ar expirado de fumantes e não fumantes para verificar se os valores são iguais ou não, ao nível de confiança de 95%. O teste mostrou que os valores da média da concentração de acroleína em indivíduos fumantes e não fumantes são diferentes ao nível

de 95% de confiança. A Tabela 13 apresenta os valores de $F_{\text{calculado}}$ e $F_{\text{crítico}}$. De acordo com o teste ANOVA se F_{cal} é maior que o valor de $F_{\text{crítico}}$ os valores são diferentes ao nível de 95% de confiança.

Tabela 13: Teste ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	F_{cal}	<i>valor-P</i>	$F_{\text{crítico}}$
Entre grupos	5,55063	1	5,55063	4,33093	0,05627	4,60011
Dentro dos grupos	17,94277	14	1,28163			
Total	23,49340	15				

O teste de Grubbs e de Dixon são testes para verificar se algum valor é *outlier*. Ambos os testes foram aplicados para verificar se o valor da concentração do indivíduo não fumante número 5 é *outlier* em relação aos demais valores encontrados. Os testes mostraram que o valor encontrado não é *outlier*, concluindo que não é possível retirar este valor para os testes das médias.

Além disso, os indivíduos analisados trabalham nos laboratórios do Departamento de Química, onde o teor de acroleína ambiental estava elevado, isto é, todos os indivíduos analisados poderiam estar expostos à acroleína.

4.9.4 - Análise de acroleína em ar ambiente interno e externo.

Após a padronização do método de permeação, o método validado para determinação de acroleína usando SPME com derivatização na fibra e análise por GC/MS foi aplicado à análise de amostras reais de ar ambiente coletadas de acordo com o procedimento descrito no item 4.8. A Tabela 14 mostra os resultados obtidos para todas as amostras e a Figura 30 apresenta a distribuição desses resultados.

Tabela 14: Concentração ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) de acroleína em ar ambiente.

Ponto de amostragem	Concentração ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)
1- Laboratório	97,52
2- Laboratório	102,07
3- Laboratório	110,15
4- Cozinha	38,33
5- Cozinha	65,16
6- Estacionamento	206,01
7- Estacionamento	64,99
8- Estacionamento	131,65
9- Parque (região arborizada)	n.d *
10- Parque (região arborizada)	n.d *

* Não detectado (abaixo do limite de detecção)

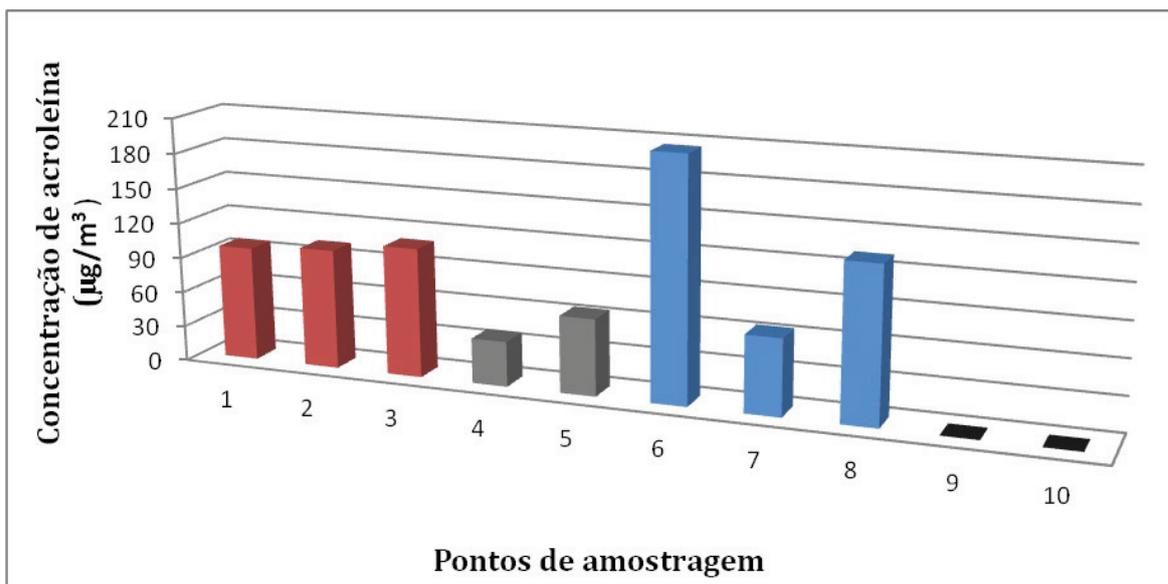


Figura 30: Concentração($\mu\text{g}/\text{m}^3$) de acroleína em ar ambiente

A concentração média de acroleína no ambiente foi de $81,59 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Todas as amostras analisadas apresentaram concentrações acima do limite de quantificação com exceção dos pontos 9 e 10 referente aos parques (regiões arborizadas). Como nessas localidades não havia fluxo de carro era esperado que a concentração de acroleína fosse menor que o limite de detecção. As maiores concentrações registradas foram para os pontos 6 e 8 referentes aos estacionamentos abertos. No período de coleta das amostras um intenso fluxo de carro foi observado aumentando a concentração de acroleína, um analito emitido pela queima de combustíveis.

O tipo de combustível usado nos automóveis afeta a concentração de acroleína emitida pelos veículos ao meio ambiente. Em estudo realizado por Corrêa, et al. [31] a emissão de acroleína foi avaliada utilizando diferentes tipos de combustíveis, diesel puro e biodiesel misturado em diesel nas proporções BX onde X é a porcentagem de biodiesel em diesel: B2 B5, B10 e B20. A concentração de acroleína foi maior quando se utiliza a mistura biodiesel B20 (20%) em diesel (80%).

Os pontos de 1 a 3 correspondem aos laboratórios químicos de análise. Os resultados encontrados nesses ambientes foram bastante relevantes e justifica-se pela ausência de ventilação adequada no local ocorrendo acúmulo

do analito no ar ambiente, pois havia manipulação do padrão de acroleína para a execução deste trabalho.

Os pontos 4 e 5 referem-se a cozinhas de restaurantes. As amostras foram coletadas em horário de intensa movimentação da cozinha, ou seja, no horário de almoço. Em ambos os ambientes foram observados o processo de fritura que é um procedimento de alta emissão de acroleína. Era de se esperar uma grande concentração de acroleína nestes ambientes, porém como estes locais eram bastante arejados as concentrações determinadas ficaram abaixo dos valores encontrados nos laboratórios.

Em trabalho realizado por Yasuhara, et. al, [41] a concentração de acroleína foi determinada em uma cozinha de restaurante durante a fritura de alimentos. O ar foi coletado próximo ao ventilador. Utilizando GC/NDP e técnica de amostragem com impinger foram encontrados valores de acroleína variando entre 0,25 a 2,96 $\mu\text{g/L}$ de acordo com uma maior movimentação da cozinha no preparo dos alimentos.

Estes resultados apontam para a necessidade de um estudo sistemático que correlacione a concentração da acroleína em ar ambiente, com a concentração de acroleína em indivíduos expostos, para garantir que a acroleína atue como um biomarcador de exposição ocupacional.

Os resultados encontrados nos ambientes externos e internos estão dentro do limite permitido pela NIOSH.

4.9.5 – Conclusão

Este estudo propõe um novo método de amostragem por microextração em fase sólida com derivatização na fibra para análise de ar expirado e ar ambiente por GC/MS. O método de extração desenvolvido é simples, rápido e de baixo custo. Para a validação do procedimento foi utilizado um sistema de geração de padrões gasosos permitindo uma melhor simulação de coleta no ar ambiente e ar expirado. O método validado apresentou boa linearidade,

limite de detecção e limite de quantificação e precisão adequados, podendo ser aplicado para análise de traço de acroleína em diferentes ambientes. As análises efetuadas mostram que um estudo mais minucioso, com maior número de indivíduos e de locais de coleta precisa ser efetuado para que se estabeleça as condições que afetam a exposição do indivíduo a este analito.

CAPÍTULO 5: Considerações finais

5- Considerações finais

Com os dados deste trabalho pode-se concluir que:

- Foi desenvolvida e validada metodologia para quantificação de acroleína em alimentos, ar expirado e ar ambiente utilizando como técnica de extração a microextração por fase sólida (SPME). O método otimizado foi adequado ao propósito do trabalho, uma vez que todos os parâmetros de desempenho estudados apresentaram valores aceitáveis;
- Para amostragem foram desenvolvidos dois processos de derivatização utilizando 2,4-DNPH, sendo eles; derivatização na solução para análise de alimento e derivatização na fibra para análise de ar expirado e ar ambiente. A derivatização mostrou-se adequada permitindo uma maior estabilidade térmica e química, além de aumentar a volatilidade do analito.
- O uso da ferramenta planejamento fatorial foi de grande importância para dar início à realização do trabalho sendo utilizada para otimizar as variáveis tempo de extração, temperatura de extração, concentração salina e tempo de dessorção para análise em alimentos e para otimizar o tempo e temperatura de extração e concentração do derivatizante na técnica de derivatização na fibra para análise do ar ambiente e ar expirado. O tempo de extração não apresentou significância ao nível de 95% de confiança, em nenhuma das técnicas estudadas permitindo um menor tempo de análise.
- Nos alimentos os baixos valores de limite de detecção e quantificação permitiram uma análise quantitativa de acroleína-DNPH menor que o limite permitido pela FDA. Para a análise de ar expirado e ar ambiente

o limite de detecção e quantificação encontrados foram elevados quando comparados com a literatura por não ter conseguido trabalhar com fluxo alto de gás diluente na câmara de permeação.

- Os resultados encontrados na batata frita mostraram que as batatas fritas em óleo de soja apresentaram menor concentração de acroleína. Para as batatas comerciais a batata palha foi a que apresentou menor concentração de acroleína quando comparada com a batata chips e a batata palito, respectivamente, devido a menor relação superfície/volume.
- A quantificação de acroleína no ar expirado de indivíduo exposto a concentrações de acroleína apresentou uma correlação significativa com a quantificação da acroleína no ar ambiente indicando que a acroleína pode ser utilizada como um biomarcador de exposição ocupacional.
- O estudo comparativo realizado pelo Teste ANOVA demonstrou que há diferença significativa entre os resultados da concentração de acroleína entre o grupo de fumantes e grupo de não fumantes, com uma probabilidade de confiança de 95% ($p < 0,05$).
- A metodologia desenvolvida apresentou sensibilidade e confiabilidade do método sugerindo a possibilidade e facilidade de analisar acroleína em diferentes matrizes.

CAPÍTULO 6: Referência Bibliográfica

1. Andrade, M.V., Pereira, P.A.P.F., Andrade, J. B.; Compostos carbonílicos atmosféricos: fontes, reatividade, níveis de concentração e efeitos toxicológicos. *Quimica Nova*, 2002. 25(6B): p. 1117-1131.
2. Committee on Aldehyde, N.R.C., Formaldehyde and Other Aldehydes. National Academy Press: Washington, DC, 1981.
3. Grosjean, D. and K. Fung, Hydrocarbons and Carbonyls in Los-Angeles Air. *Journal of the Air Pollution Control Association*, 1984. 34(5): p. 537-543.
4. Grosjean, D., Miguel, A.H., and Tavares, T.M., Urban Air-Pollution in Brazil - Acetaldehyde and Other Carbonyls. *Atmospheric Environment Part B-Urban Atmosphere*, 1990. 24(1): p. 101-106.
5. Hodgson, A.T., Wooley, J.D., and Daisey, J.M., Emissions of Volatile Organic-Compounds from New Carpets Measured in a Large-Scale Environmental Chamber. *Journal of the Air & Waste Management Association*, 1993. 43(3): p. 316-324.
6. Gilbert, N.L., et al., Levels and determinants of formaldehyde, acetaldehyde, and acrolein in residential indoor air in Prince Edward Island, Canada. *Environmental Research*, 2005. 99(1): p. 11-17.
7. Ghilarducci, D.P. and Tjeerdema, R.S., Fate and effects of acrolein. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol 144, 1995. 144: p. 95-146.
8. [IARC], Agents reviewed by the IARC monographs.
9. Iazard, C. and Libermann, C., Acrolein. *Mutation Research*, 1977. 47(2): p. 115-138.
10. Kehrer, J.P. and Biswal, S.S., The molecular effects of acrolein. *Toxicological Sciences*, 2000. 57(1): p. 6-15.
11. National Ambient Air Monitoring Conference. 2009.
12. Souza, C., <http://www.souzacruz.com.br>.
13. EPA, Compendium of Methods for Determination of Toxic Organic Compounds in Ambient Air. Environmental Protection Agency; Center for Environmental Research Information: Cincinnati, 1999.
14. HazDat, Acrolein. HazDat Database: ATSDR's Hazardous Substance Release and Health Effects Database. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2005.
15. CETESB, Manual de Produtos Químicos Perigosos. 2002.
16. Della Rosa, H.V.S., Siqueira, M.E.B.; Colacioppo, S., Monitorização

- Ambiental e Biológica. In. OGA, S. Fundamentos de Toxicologia, 2003: p. 148-161.
17. Amorin, L.C.A., Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. Brás. Epidemiol, 2003. 6: p. 158-170.
 18. Lauwerys, R.H.P., Industrial Chemical Exposure. Guidelines for Biological Monitoring, Lewis Publishers, 1993.
 19. [INSHT], Instituto Nacional de Seguridad e Higiene em el Trabajo. 2007.
 20. ACGIH, Threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposure indices. American Conference of Governmental Industrial Hygienists: Cincinnati, OH, 2008.
 21. OSHA, Limits for air contaminants. Occupational safety and health standards. Occupational Safety and Health Administration. Code of Federal Regulations., 2005.
 22. WHO, Guidelines for drinking water. 2002.
 23. FDA -. Code of Federal Regulations. 21 CFR 172.892. 1988.
 24. [BRASIL]- Ministério do Trabalho e Emprego. Norma Regulamentadora nº 15. Brasil: Ministério do Trabalho e Emprego, 1978.
 25. ANVISA, Informe Técnico nº 11. 5 de outubro de 2004

 26. Hess, L.G., Kurtz, A. N., Stanton, D. B, Acrolein and Derivatives. In: Grayson M, Eckroth D. Kirk-Othmer encyclopedia of Chemicals technology, 1978. 1: p. 277-297.
 27. Veloso, M.C.C., Determinação de ácidos graxos e compostos orgânicos voláteis em peixes. Tese de doutorado - UFBA, 2005.
 28. Vogel, M., Buldt, A., and Karst, U. Hydrazine reagents as derivatizing agents in environmental analysis - a critical review. Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 2000. 366(8): p. 781-791.
 29. Guarieiro, L.L.N., et al., Carbonyl compounds emitted by a diesel engine fuelled with diesel and biodiesel-diesel blends: Sampling optimization and emissions profile. Atmospheric Environment, 2008. 42(35): p. 8211-8218.
 30. Kiss, G., et al., Sample preparation of atmospheric aerosol for the determination of carbonyl compounds. Talanta, 1999. 48(4): p. 755-762.
 31. Correa, S.M. and Arbilla, G., Carbonyl emissions in diesel and biodiesel exhaust. Atmospheric Environment, 2008. 42(4): p. 769-775.

32. Thweatt, W.D., Harward, C.N., and Parrish, M.E., Measurement of acrolein and 1,3-butadiene in a single puff of cigarette smoke using lead-salt tunable diode laser infrared spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2007. 67(1): p. 16-24.
33. Fung, K. and Grosjean, D. Determination of Nanogram Amounts of Carbonyls as 2,4-Dinitrophenylhydrazones by High-Performance Liquid-Chromatography. *Analytical Chemistry*, 1981. 53(2): p. 168-171.
34. Lee, Y.N. and Zhou, X.L. Method for the Determination of Some Soluble Atmospheric Carbonyl-Compounds. *Environmental Science & Technology*, 1993. 27(4): p. 749-756.
35. Roy, M.M., HPLC analysis of aldehydes in automobile exhaust gas: Comparison of exhaust odor and irritation in different types of gasoline and diesel engines. *Energy Conversion and Management*, 2008. 49(5): p. 1111-1118.
36. Dong, J.Z. and Moldoveanu, S.C. Gas chromatography-mass spectrometry of carbonyl compounds in cigarette mainstream smoke after derivatization with 2,4-dinitrophenylhydrazine. *Journal of Chromatography A*, 2004. 1027(1-2): p. 25-35.
37. Fullana, A., Carbonell-Barrachina, A.A. and Sidhu, S. Comparison of volatile aldehydes present in the cooking fumes of extra virgin olive, olive, and canola oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004. 52(16): p. 5207-5214.
38. Lane, R.H. and Smathers, J.L. Monitoring Aldehyde Production during Frying by Reversed-Phase Liquid-Chromatography. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 1991. 74(6): p. 957-960.
39. Thomas, M.J., et al., Detecting and Identifying Volatile Aldehydes as Dinitrophenylhydrazones Using Gas-Chromatography Mass-Spectrometry. *Free Radical Biology and Medicine*, 1995. 18(3): p. 553-557.
40. Umano, K. and Shibamoto, T. Analysis of Acrolein from Heated Cooking Oils and Beef Fat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1987. 35(6): p. 909-912.
41. Yasuhara, A. and Shibamoto, T. Determination of Acrolein Evolved from Heated Vegetable Oil by N-Methylhydrazine Conversion. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1991. 55(10): p. 2639-2640.
42. Andreu-Sevilla, A.J., et al., Health Benefits of Using Red Palm Oil in Deep-

- frying Potatoes: Low Acrolein Emissions and High Intake of Carotenoids. *Food Science and Technology International*, 2009. 15(1): p. 15-22.
43. Wardencki, W., Sowinski, P. and Curylo, J.; Evaluation of headspace solid-phase microextraction for the analysis of volatile carbonyl compounds in spirits and alcoholic beverages. *Journal of Chromatography A*, 2003. 984(1): p. 89-96.
 44. Azevedo, L.C., et al., Effects of carbonylic compound presence and concentration on wine quality. *Quimica Nova*, 2007. 30(8): p. 1968-1975.
 45. Saison, D., et al., Determination of carbonyl compounds in beer by derivatisation and headspace solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2009. 1216(26): p. 5061-5068.
 46. Fais, A., Pollution from motor vehicles: issues and option for Latin American countries. *Science of the Total Environment* 1995. 169: p. 303-310.
 47. Seaman, V.Y., Bennett, D.H. and Cahill, T.M., Origin, occurrence, and source emission rate of acrolein in residential indoor air. *Environmental Science & Technology*, 2007. 41(20): p. 6940-6946.
 48. Uchiyama, S., Ando, M. and Aoyagi, S., Isomerization of aldehyde-2,4-dinitrophenylhydrazone derivatives and validation of high-performance liquid chromatographic analysis. *Journal of Chromatography A*, 2003. 996(1-2): p. 95-102.
 49. Veloso, M.C.C.S., Santos, V. M.; G. V.; de Andrade, J. B, Determination of Aldehydes in Fish by High-Performance Liquid Chromatography *Journal Chromatography Science*, 2001(39): p. 173
 50. Uchiyama, S., et al., Measurement of acid-catalyzed isomerization of unsaturated aldehyde-2,4-dinitrophenylhydrazone derivatives by high-performance liquid chromatography analysis. *Analytica Chimica Acta*, 2004. 523(2): p. 157-163.
 51. Campos, L.P.S.C., Métodos de amostragem e análise para compostos reduzidos de enxofre atmosférico. *Química Nova*, 2008. 31(5): p. 1180-1189.
 52. Droz, P.O. and Guillemin, M.P., Occupational Exposure Monitoring Using Breath Analysis. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 1986. 28(8): p. 593-602.
 53. Giardina, M. and Olesik, S.V., Application of low-temperature glassy carbon-

- coated macrofibers for solid-phase microextraction analysis of simulated breath volatiles. *Analytical Chemistry*, 2003. 75(7): p. 1604-1614.
54. Arthur, C.L.P.J., Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal. Chem*, 1990. 62: p. 2145-2148.
 55. Valente, A.L.P. and Augusto, F., SPME, solid phase micro-extraction. *Quimica Nova*, 2000. 23(4): p. 523-530.
 56. Pawliszyn, J., *Solid Phase Microextraction - Theory and Practice*; Wiley-VCH. 1997.
 57. Parreira, F., Cardeal, Z.L, Amostragem de compostos orgânicos no ar utilizando a técnica de microextração em fase sólida. *Química Nova*, 2005. 28(4): p. 646-654.
 58. Pawliszyn, J., *Applications of Solid Phase Microextraction*. Royal Society Chemistry: Cambridge, 1995.
 59. Iglesias, J., Gallardo, J.M. and Medina, I., Determination of carbonyl compounds in fish species samples with solid-phase microextraction with on-fibre derivatization. *Food Chemistry*, 2010. 123(3): p. 771-778.
 60. Neto, B. B., Scarminio, I. S., Bruns, R.E, *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. 2003.
 61. Teófilo, R.F.F., *Quimiometria II: Planilhas Eletrônicas para Cálculos de Planejamentos Experimentais, um Tutorial*. *Química Nova*, 2009. 29(2): p. 338-350.
 62. EURACHEM., *The Fitness for Purpose of Analytical Methods, a Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. 1998.
 63. Souza, S.V.C.B., Brito, R.B, *Validação de métodos: aplicação em análises de resíduos em alimentos*. Encontro para a Qualidade de Laboratórios. Anais. São Paulo: REMESP, 2002: p. 155-163.
 64. EURACHEM, *Guide to Quality in Analytical Chemistry na AID to Accreditation*. 2002.
 65. Ribani, M., et al., Validation for chromatographic and electrophoretic methods. *Quimica Nova*, 2004. 27(5): p. 771-780.
 66. ICH, International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. *Validation of analytical procedures*. 1996.
 67. Draper, N., Smith, H. , *Applied regression Analysis*. NY: Wiley. 1998.
 68. Bao, M.L., et al., Determination of carbonyl compounds in water by

- derivatization - solid-phase microextraction and gas chromatographic analysis. *Journal of Chromatography A*, 1998. 809(1-2): p. 75-87.
69. Sowinski, P., Wardencki, W. and Partyka, M. Development and evaluation of headspace gas chromatography method for the analysis of carbonyl compounds in spirits and vodkas. *Analytica Chimica Acta*, 2005. 539(1-2): p. 17-22.
70. Ledauphin, J., et al., Development of an accurate and sensitive gas chromatographic method for the determination of acrolein content in Calvados and cider. *Lwt-Food Science and Technology*, 2006. 39(9): p. 1045-1052.
71. Smith, L.M., et al., Lipid-Content and Fatty-Acid Profiles of Various Deep-Fat Fried Foods. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 1985. 62(6): p. 996-999.
72. Bouchon, P., Aguilera, J.M., Pyle, D.L., Structure oil-absorption relationships during deep-fat frying. *Journal of Food Science*, 2003. 68(9): p. 2711-2716.
73. Jorge, N.L., Lunardi, V. M., Influência dos tipos de óleos e tempos de Fritura na perda de umidade e absorção de óleo em batatas fritas. *Ciencia Agrotec.*, Lavras, 2005. 29: p. 635-641.
74. Damy, P.C., Alterações físico-químicas de óleo de soja e da gordura hidrogenada durante o processo de fritura descontínua de batatas. Dissertação de mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2001.
75. Pozo-Díez, R.M., Estudio del proceso de fritura de alimentos frescos y congelados prefritos: comportamiento del aceite de semilla de girasol de alto contenido en ácido oleico. Tese de doutorado em Farmácia – Facultad de Farmacia, Universidad de Alcalá de Henares, Espanha, 1995.
76. Paul, S. and Mittal, G.S., Regulating the use of degraded oil/fat in deep-fat/oil food frying. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1997. 37(7): p. 635-662.
77. Silva, T.O. and Pereira, P.A.D. Influence of time, surface-to-volume ratio, and heating process (continuous or intermittent) on the emission rates of selected carbonyl compounds during thermal oxidation of palm and soybean oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008. 56(9): p. 3129-3135.
78. Bouchon, P. and Pyle, D.L. Studying oil absorption in restructured potato chips. *Journal of Food Science*, 2004. 69(3): p. E115-E122.

79. Rossi, M., et al., Suitability of contact angle measurement as an index of overall oil degradation and oil uptake during frying. *Food Chemistry*, 2009. 112(2): p. 448-453.
80. Grote, C. and Pawliszyn, J., Solid-phase microextraction for the analysis of human breath. *Analytical Chemistry*, 1997. 69(4): p. 587-596.
81. Moldoveanu, S.C. and Dong, J.Z., Gas chromatography-mass spectrometry of carbonyl compounds in cigarette mainstream smoke after derivatization with 2,4-dinitrophenylhydrazine. *Journal of Chromatography A*, 2004. 1027(1-2): p. 25-35.
82. Herrington, J.S. and Zhang, J.J., Development of a method for time-resolved measurement of airborne acrolein. *Atmospheric Environment*, 2008. 42(10): p. 2429-2436.
83. Picklo, M.J., et al., Carbonyl toxicology and Alzheimer's disease. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2002. 184(3): p. 187-197.