



INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Centro de Tecnologia de Embalagem - CETEA

GABRIELA CHAGAS CORREA

DETERMINAÇÃO DE HIDROCARBONETOS SATURADOS E AROMÁTICOS
DE ÓLEO MINERAL EM MATERIAL CELULÓSICO
PARA EMBALAGEM DE ALIMENTOS

CAMPINAS

2019

GABRIELA CHAGAS CORREA

**DETERMINAÇÃO DE HIDROCARBONETOS SATURADOS E AROMÁTICOS
DE ÓLEO MINERAL EM MATERIAL CELULÓSICO
PARA EMBALAGEM DE ALIMENTOS**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Tecnologia de Alimentos para obtenção do
título de Mestre em Ciência e Tecnologia
de Alimentos.*

Aluno: Gabriela Chagas Correa
Orientadora: Profa. Dra. Marisa Padula

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação defendida pela aluna Gabriela Chagas Correa e orientada pela Profa. Dra. Marisa Padula.

CAMPINAS

2019

O presente trabalho foi realizado com os seguintes apoios:

*Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
Brasil (CAPES). Código de Financiamento 001*

Fundação de Desenvolvimento da Pesquisa do Agronegócio (FUNDEPAG)

Ficha Catalográfica

Biblioteca do Instituto de Tecnologia de Alimentos
Elaborado por: Lucilene Paulina da Silva – CRB 8/8507

C824d Correa, Gabriela Chagas.

Determinação de hidrocarbonetos saturados e aromáticos de óleo mineral em material celulósico para embalagem de alimentos. Gabriela Chagas Correa / Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. - Campinas, SP: Itai, 2019.

88 f.

Orientador: Dra. Marisa Padula.

1. MOSH. 2. MOAH. 3. Cartão. 4. Material Reciclado. 5. SPE-GC-FID off-line. 6. PTV (LVI). I. Instituto de Tecnologia de Alimentos (Itai) / Centro de Tecnologia de Embalagem (Cetea). II. Correa, Gabriela Chagas. III. Título.

Título em inglês: Determination of Mineral Oil Saturated Hydrocarbons and Mineral Oil Aromatic Hydrocarbons in Cellulosic Food Packaging Material.

Key-words: MOSH; MOAH; cardboard; recycled material; off-line SPE-(PTV)-(LVI)-GC-FID.

Titulação: Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Banca Examinadora: Marisa Padula, Leda Coltro, Maria Teresa Alvarenga Freire, Anna Lucia Mourad

Data da Defesa: 22 de agosto de 2019.

Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida por Gabriela Chagas Correa, aprovada pela Comissão Julgadora em 22 de agosto de 2019.

Profa. Dra. Marisa Padula

Instituto de Tecnologia dos Alimentos – ITAL / CETEA (Presidente)

Profa. Dra. Leda Coltro

Instituto de Tecnologia dos Alimentos – ITAL / CETEA

Profa. Dra. Maria Tereza de Alvarenga Freire

Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – FZEA / USP

Profa. Dra. Anna Lucia Mourad

Instituto de Tecnologia dos Alimentos – ITAL / CETEA (Suplente)

A ata de defesa de dissertação de mestrado com as respectivas assinaturas dos membros da banca encontra-se arquivada junto à documentação do aluno.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Itamar e Dorothea, por me apoiarem e incentivarem a correr atrás de meus sonhos e ambições.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir realizar este sonho, pelo Seu incondicional e infinito amor, por Sua voz “invisível” que não me deixou desistir e principalmente por ter me dado uma família tão incrível e presente.

À Profa. Dra. Marisa Padula, pela orientação, competência e dedicação tão importantes. Nas tantas vezes que nos reunimos e, embora em algumas eu chegasse desestimulada, bastavam alguns minutos de conversa e umas poucas palavras de incentivo e lá estava eu, com o mesmo ânimo do primeiro dia. Obrigada por acreditar em mim e pelos tantos elogios e incentivos. Tenho certeza de que não chegaria até aqui sem o seu apoio.

Aos membros da banca examinadora, Dra. Leda Coltro, Dra. Maria Tereza de Alvarenga Freire e Dra. Anna Lucia Mourad, que tão gentilmente aceitaram participar e colaborar com esta dissertação.

Ao Prof. Dr. Marcelo Antônio Morgano e à Dra. Raquel Fernanda Milani por terem sido os primeiros a acreditar em mim e me incentivar e orientar a participar do programa de mestrado do ITAL. Embora o destino nos tenha traçado caminhos diferentes, ficaram as marcas de respeito e admiração.

À Papyrus, pela bolsa concedida pelo período de um ano e por todo apoio que me foi dado ao longo do trabalho.

À FUNDEPAG pelo apoio financeiro ao trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) que apoiou a realização do presente trabalho - Código de Financiamento 001 e CETEA/ITAL/APTA/SAA.

Ao CETEA pelo suporte e pela infraestrutura disponibilizados para a realização deste trabalho. Aos funcionários do CETEA, todos sempre solícitos e atenciosos comigo.

À Pós-Graduação do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) e aos docentes do programa por todo suporte e conhecimento que me foram passados ao longo desses dois anos e seis meses.

Às minhas colegas da pós-graduação, que acredito terem se tornado minhas amigas, muito obrigada pelo apoio e incentivo.

Por fim, a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desta dissertação, o meu sincero agradecimento.

SIGLAS

MOH: *Mineral Oil Hydrocarbons* (Hidrocarbonetos de Óleo Mineral).

MOSH: *Mineral Oil Saturated Hydrocarbon*

MOAH: *Mineral Oil Aromatic Hydrocarbon*

SPE: *Solid Phase Extraction* (Extração em Fase Sólida).

GC-FID: *Gas Chromatography - Flame Ionization Detector* (Cromatografia Gasosa com Detecção por Ionização de Chama).

MMI – *Multimode Inlet*.

PTV - *Programmed Temperature Vaporization* (Vaporização com Temperatura Programada).

LVI – *Large Volume Injection* (Injeção de Grande Volume).

DRRR – *Deutsches Referenzbüro für Ringversuche und Referenzmaterialien* (Escritório de Referência Alemão para Testes de Proficiência e Materiais de Referência).

RESUMO

O óleo mineral é composto por hidrocarbonetos saturados (MOSH) e aromáticos (MOAH) e pode estar presente em tintas de impressão usadas em embalagens de alimentos. As embalagens celulósicas feitas de material reciclado podem conter porções significativas de óleo mineral. Os MOSH consistem em alcanos lineares ou ramificados e ciclo-alcanos substituídos com grupos alquila, enquanto que os MOAH incluem principalmente hidrocarbonetos poli - aromáticos substituídos com alquila. As principais fontes de hidrocarbonetos de óleo mineral (MOH) em alimentos são embalagens de alimentos e aditivos, auxiliares de processamento e lubrificantes. Os MOSH de 16 carbonos (C16) a 35 carbonos (C35), podem se acumular em vários tecidos incluindo adiposo, linfonodos, baço e fígado podendo causar micro granulomas. Os MOAH com três ou mais anéis aromáticos não alquilados ou pouco alquilados podem ser mutagênicos e carcinogênicos e, portanto, são potencialmente preocupantes. Como ainda não existem estudos sobre a presença e quantidade de MOH em materiais de embalagem para contato com alimentos no Brasil, este trabalho teve como objetivo principal estabelecer um método de determinação de MOH, baseado no método do BfR (2012) que usa um cartucho de extração em fase sólida de nitrato de prata / sílica gel ativada para a pré-separação e GC-FID para a quantificação das frações de MOSH e de MOAH, a fim de monitorar a presença destas substâncias em cartões feitos com diferentes teores de aparas pré e pós-consumo. O método se mostrou adequado para análise de cartões de material reciclado e cartões de fibra virgem, além de aparas pré e pós-consumo. Nos cartões feitos com material reciclado as concentrações determinadas de óleo mineral foram de 13,1 – 36,9 mg/kg para MOSH e de 29,1 – 50,8 mg/kg para MOAH, sendo que esses valores variam em função da época de produção dos cartões. As aparas pós-consumo apresentaram maiores teores de óleo mineral (305,7 mg/kg para MOSH e 187,2 mg/kg para MOAH) do que as aparas pré-consumo (41,5 mg/kg para MOSH e 50,9 mg/kg para MOAH). Foi observado que mesmo os cartões 100% fibra virgem apresentaram óleo mineral (14,5 – 21,4 mg/kg para MOSH e 16,0 – 22,5 mg/kg para MOAH).

Palavras-chave: MOSH; MOAH; cartão; material reciclado; SPE-GC-FID off-line, PTV (LVI).

ABSTRACT

Mineral oil is composed of saturated (MOSH) and aromatic (MOAH) hydrocarbons and may be present in printing inks used in food packaging. Cellulosic packaging made from recycled material may contain significant portions of mineral oil. MOSH consist of straight or branched alkanes and cycloalkanes substituted with alkyl groups, whereas MOAH include mainly alkyl substituted polyaromatic hydrocarbons. The main sources of mineral oil hydrocarbons (MOH) in foods are food packaging and additives, processing aids and lubricants. MOSH of 16 carbon (C16) to 35 carbon (C35) can accumulate in different human tissues including the spleen, liver, lymph nodes, and adipose tissue, and can cause micro granulomas. MOAHs with three or more unalkylated or poorly alkylated aromatic rings can be mutagenic and carcinogenic and are therefore a matter of concern. There are no studies on the presence and quantities of MOH in food contact packaging materials in Brazil. This study aimed to establish a method of MOH determination to monitor the presence of these substances on cardboards made with different pre and post-consumption scrap contents. The method was based on the BfR (2012) method, which uses a nitrate / silica gel activated solid phase extraction cartridge for pre-separation, and GC-FID for the quantification of the MOSH and MOAH fractions. The method proved to be suitable for the analysis of recycled and virgin cardboard, as well as pre and post-consumption scrap. In cards made from recycled material, the determined mineral oil concentrations were 13.1 – 36.9 mg / kg for MOSH and 29.1 – 50.8 mg / kg for MOAH, and these values vary depending on the time of production of the material. The post-consumption scrap had higher mineral oil content (305.7 mg / kg for MOSH and 187.2 mg / kg for MOAH) than pre-consumption scrap (41.5 mg / kg for MOSH and 50.9 mg / kg for MOAH). Even 100% virgin cardboards had mineral oil contents (14.5 – 21.4 mg / kg for MOSH and 16.0 – 22.5 mg / kg for MOAH).

Key words: MOSH; MOAH; cardboard; recycled material; SPE-GC-FID off-line, PTV (LVI).

SUMÁRIO

SIGLAS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	2
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
3.1. Introdução	3
3.2. Origem dos hidrocarbonetos de óleo mineral (MOH)	4
3.3. Classes de MOH relevantes para a segurança de alimentos.....	6
3.4. Dados toxicológicos de MOH	7
3.5. Legislação	11
3.6. Métodos Analíticos de Determinação de MOH	12
3.6.1. Óleos Minerais.....	12
3.6.2. Preparo de Amostras Sólidas	15
3.6.3. Determinação Analítica.....	21
3.7. Fabricação de Papel e Cartão.....	28
4. AMOSTRAS	33
4.1. Amostras de Cartão da Análise Interlaboratorial.....	33
4.2. Amostras	33
5. MATERIAIS E MÉTODO	34
5.1. Materiais.....	35
5.1.1. Solventes e Vidrarias	35
5.1.2. Padrões Analíticos.....	35
5.1.3. Equipamento	37
5.2. Controle para minimização de contaminação	37
5.3. Procedimentos do Método	38
5.3.1. Preparo de Soluções Estoque, Mix de Padrão Interno (P.I) e Sílica gel / 1% Ag.....	38
<i>Preparo de Soluções Estoque (A-F)</i>	38
<i>Preparo do Mix de P.I</i>	39
<i>Preparo da sílica gel / 1% AgNO₃</i>	40
5.3.2. Etapas do Procedimento Experimental.....	40
<i>Descontaminação de Vidrarias</i>	40

<i>Preparo da sílica gel ativada (400 °C/4h) / 0,3% AgNO₃</i>	40
<i>Preparação da Amostra - Corte e Homogeneização</i>	41
<i>Preparo das colunas de SPE</i>	41
<i>Preparo da Amostra</i>	41
<i>Preparo do Eluente B (EB)</i>	42
<i>Procedimento de Extração em Fase Sólida (SPE)</i>	42
<i>Procedimento de evaporação de solvente</i>	44
<i>GC-FID com injetor MMI (PTV)</i>	44
<i>Cálculo da concentração de MOSH e MOAH</i>	47
5.4. Análise Estatística.....	50
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES	50
6.1. Análise Interlaboratorial (DRRR).....	50
6.1.1. Limites de Detecção e Quantificação	51
6.1.2. Amostra 1	52
6.1.3. Amostra 2	54
6.2. Amostras de Aparas.....	56
6.2.1. Pré-Consumo (AP1)	56
6.2.2. Pós-Consumo (AP2).....	56
6.3. Amostras de Cartão	57
6.3.1. Cartão tipo 1	57
6.3.2. Cartão tipo 2	60
6.3.3. Fibra Virgem Época 2.....	62
6.3.4. Fibra Virgem Época 3.....	63
7. CONCLUSÕES	68
8. RECOMENDAÇÕES	68
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
10. Anexos	76
Anexo 1 Esquema do procedimento de SPE	77
Anexo 2 Resultados do Ensaio Interlaboratorial (DRRR) Amostra 1	78
Anexo 3 Resultados do Ensaio Interlaboratorial (DRRR) Amostra 2	82
Anexo 4 Cromatogramas Amostra 1 Análise Interlaboratorial	86
Anexo 5 Cromatogramas Amostra 2 Análise Interlaboratorial	88

1. INTRODUÇÃO

Com o propósito de atender a objetivos econômicos, ecológicos e de sustentabilidade, as embalagens celulósicas são largamente produzidas com papel reciclado. As caixas de cartão feitas de material reciclado podem conter porções significativas de óleo mineral. O óleo mineral é composto por hidrocarbonetos saturados (MOSH) e aromáticos (MOAH) e pode estar presente em tintas de impressão usadas em embalagens de alimentos (BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG, 2009).

Devido ao fato dos componentes da tinta de impressão não serem completamente removidos durante a reciclagem do papel para produção da embalagem celulósica, os componentes do óleo mineral podem ser encontrados em papel reciclado em quantidades significativas. Segundo Biedermann e Grob (2010) o cartão com fibras recicladas, não impresso, pode conter cerca de 300 a 1000 mg/kg de componentes de óleo mineral de até C28. Portanto, se alimentos secos, como arroz e macarrão, são acondicionados em embalagens celulósicas feitas de material reciclado, é possível que ocorra a migração de componentes do óleo mineral da embalagem para o alimento. Os hidrocarbonetos de cadeia curta são mais facilmente absorvidos pelo organismo. Estudos com animais demonstraram que os componentes do óleo mineral são absorvidos pelo corpo e armazenados em vários órgãos, em particular, no fígado e nos gânglios linfáticos (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2012).

Em 2012, o Painel Científico de Contaminantes na Cadeia Alimentar (painel CONTAM) da *European Food Safety Authority* (EFSA) (Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos) concluiu que o impacto potencial dos diversos grupos de hidrocarbonetos de óleo mineral (MOH) na saúde humana é muito variável. Os MOAH podem atuar como substâncias carcinogênicas e genotóxicas. Já alguns MOSH são suscetíveis de se acumular nos tecidos humanos e podem produzir efeitos adversos no fígado. Alguns MOAH são considerados mutagênicos e carcinogênicos, por isso é importante que seja feito um monitoramento dos MOH de modo a compreender e conhecer melhor a presença de MOSH e MOAH nos alimentos, principalmente naqueles que mais contribuem para a exposição da população a essas substâncias. Tendo em vista

a suspeita de que a migração a partir de materiais em contato com alimentos, como as embalagens celulósicas, contribui significativamente para a exposição total do consumidor, o monitoramento deve incluir também o material de embalagem (COMISSÃO EUROPEIA, Recomendação UE 2017/84).

Em 16 de janeiro de 2017, foi publicado no Jornal Oficial da União Europeia a Recomendação (UE) 2017/84 da Comissão Europeia relativa ao monitoramento de hidrocarbonetos de óleos minerais nos alimentos e em materiais e objetos destinados a entrar em contato com alimentos. Segundo a Recomendação, os Estados-Membros deveriam monitorar a presença dos MOH nos alimentos e nos materiais em contato com esses alimentos entre 2017 e 2018, com a participação ativa das empresas do setor de alimentos bem como dos fabricantes, transformadores e distribuidores de materiais em contato com alimentos e de outras partes interessadas.

Não há limites estabelecidos para MOSH e MOAH na Resolução nº 88 de 29 de junho de 2016, que aprova o regulamento técnico sobre materiais, embalagens e equipamentos celulósicos destinados a entrar em contato com alimentos e dá outras providências, (BRASIL, 2016). Ainda não existem estudos no Brasil sobre a presença e quantidade de MOH em materiais destinados a entrar em contato com alimentos. Portanto, este trabalho tem como objetivo principal estabelecer um método para determinação de MOH e monitorar a presença destas substâncias em cartões com diferentes porcentagens de fibra reciclada e em aparas de papel pré e pós-consumo. Todas as amostras foram fornecidas por uma empresa que recicla papel e produz este material para a fabricação de embalagem celulósica para contato com alimentos.

2. OBJETIVOS

Dar início as pesquisas no Brasil quanto à presença de MOH em embalagens celulósicas para contato com alimentos.

Implantar o método para detecção e quantificação de hidrocarbonetos saturados (MOSH) e aromáticos (MOAH) de óleo mineral, presentes em material celulósico para embalagem de alimentos, com possibilidade de uso do mesmo para determinação de MOH provenientes de poliolefinas, baseando-se no método do BfR de 2012.

Determinar a concentração de MOSH e MOAH em cartões, com diferentes porcentagens de material reciclado, que são utilizados na fabricação de embalagens celulósicas para alimentos.

Determinar a concentração de MOSH e MOAH em aparas pré e pós-consumo.

Avaliar a influência da época de produção dos cartões e do tipo de apara, pré e pós-consumo, no teor de óleo mineral encontrado no material.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Introdução

Frequentemente subestimada, a contaminação de alimentos por hidrocarbonetos de óleo mineral pode ser uma ameaça aos consumidores. Diferente de outros xenobióticos, como os pesticidas, para os quais a fonte e seu emprego são estritamente regulamentados, a fonte de contaminação por hidrocarbonetos de óleo mineral pode ser difícil de prever ou até mesmo inesperada, e muitas vezes não é regulamentada por lei. Esta contaminação pode ocorrer em qualquer estágio da produção de alimentos, como contaminação em campo, práticas agrícolas, processos de transformação (doméstico e industrial) de alimentos e migração a partir de materiais de embalagem (EFSA, 2012; PURCARO; BARP; MORET, 2016). Esta revisão tratará de uma das principais classes de hidrocarbonetos que é a originária de processos petrogênicos.

O processo petrogênico consiste na transformação diagenética (processos geológicos de baixa temperatura que sucedem à deposição de sedimentos formando rochas sedimentares – litificação) de grande parte do material vegetal depositado no fundo na crosta terrestre, formando o petróleo bruto, do qual são obtidos diferentes produtos petrolíferos para uso humano através de processos de destilação e diversas etapas de refino. Durante o processo de refinamento os produtos petrolíferos são enriquecidos com hidrocarbonetos deixando no resíduo a maior parte da matéria bruta inorgânica e outros tipos de compostos orgânicos contendo enxofre, nitrogênio e oxigênio (EFSA, 2012).

Hidrocarbonetos de petróleo ou hidrocarbonetos de óleo mineral (MOH) são uma mistura muito complexa de isômeros relacionados principalmente a duas classes de compostos: hidrocarbonetos saturados de óleo mineral (MOSH) e hidrocarbonetos aromáticos de óleo mineral (MOAH). Os MOSH incluem hidrocarbonetos alifáticos, lineares e ramificados (alcanos e isoalcanos, também chamados de parafinas e isoparafinas), e compostos cíclicos (cicloalcanos ou naftenos) com possível alquilação lateral. Os MOAH incluem um ou mais anéis de benzeno como componentes estruturais, mas os anéis de benzeno alquilados são predominantes em relação aos não-alkilados, diferentemente dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA's) que são de origem pirogênica (EFSA, 2012; PURCARO; BARP; MORET, 2016).

Durante a combustão da matéria orgânica (processo pirogênico), todos os compostos contendo carbono e hidrogênio são parcialmente divididos em pequenos fragmentos instáveis (pirólise), principalmente radicais, que se recombinam (pirossíntese) para formar compostos cíclicos relativamente estáveis com 2-7 anéis de benzeno fundidos em diferentes configurações. No entanto, a composição dos HPA's, originários da combustão, também chamados de HPA's parentais, é notavelmente diferente daqueles produzidos pelo processo petrogênico (MOAH) (PURCARO; BARP; MORET, 2016).

A classe de contaminantes de origem petrogênica, MOH, que pode contaminar alimentos através de diferentes fontes, será discutida a partir de sua fonte e ocorrência nos alimentos, sua toxicidade e legislação, além das abordagens analíticas propostas.

3.2. Origem dos hidrocarbonetos de óleo mineral (MOH)

Os hidrocarbonetos de óleo mineral (MOH) ocorrem nos alimentos tanto como resultado de contaminação quanto como resultado de várias utilizações intencionais na produção de alimentos. São derivados principalmente da destilação do petróleo bruto, mas também são produzidos sinteticamente a partir de carvão, gás natural e biomassa. Eles entram em contato com alimentos através de várias fontes, como a contribuição ambiental do ar ou do ecossistema aquático, máquinas durante a colheita e processamento, auxiliares de processamento e materiais em contato com alimentos (principalmente

embalagens). A composição dos MOH varia muito: os óleos de grau alimentício (largamente usados na indústria alimentícia) são declarados livres de MOAH, mas a maioria das outras fontes contém 10-30% de MOAH (EFSA, 2012). Além disso, a massa molecular varia ao longo de uma ampla gama, desde diluentes bastante voláteis até óleos lubrificantes, influenciando o modo de contaminação de alimentos por MOH, através do contato direto ou através da fase gasosa (para hidrocarbonetos voláteis) (PURCARO; BARP; MORET, 2016). Uma contaminação de fundo frequentemente visível em material vegetal e alimentos de origem vegetal deriva de material particulado proveniente de combustão incompleta de óleo diesel, óleo lubrificante (óleo de motor não queimado emitido por veículos motorizados), detritos de estrada e alcatrão (NEUKOM et al., 2002). Alimentos processados podem ser contaminados com óleos minerais de grau alimentício (tratados para eliminar MOAH), amplamente utilizados na indústria de alimentos como lubrificantes, agentes desmoldantes, supressores de poeira para grãos ou alimentos para animais, revestimentos de proteção para frutas e vegetais crus e em alguns casos como aditivos (ceras microcristalinas utilizadas, por exemplo, como agentes de revestimento em produtos de confeitaria e carne congelada) (EFSA, 2012). Materiais em contato com alimentos são outra fonte importante de contaminação e, em particular, papel, cartão e papelão (ondulado) reciclado usado como embalagem para vários alimentos secos (como massas, arroz, mas também alimentos de panificação) e tintas de impressão à base de óleo mineral (BIEDERMANN; GROB, 2012b).

Em 2012, o Painel da EFSA sobre “Contaminantes na Cadeia Alimentar” (Painel CONTAM) emitiu um parecer científico sobre os hidrocarbonetos de óleos minerais em alimentos, atendendo a um pedido da Comissão Europeia. O painel identificou várias fontes para a ocorrência de MOH em alimentos. Dentre as fontes referentes aos materiais em contato com alimento, estão os materiais de embalagem feitos de papel e cartão reciclado, as tintas de impressão aplicadas ao papel e cartão, os MOH utilizados como aditivos na fabricação de plásticos, por exemplo, os lubrificantes internos em poliestireno, poliolefinas, os adesivos utilizados em embalagens, papel e cartão com cera, e sacos de juta ou de sisal acrescidos de doses de óleo mineral (COMISSÃO EUROPEIA, Recomendação UE 2017/84).

Para os óleos minerais de média e baixa viscosidade (mais relevantes como contaminantes em alimentos), foram especificadas três classes de acordo com o JECFA (do inglês: The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) (2002): Os óleos minerais de Classe I são os de massa molecular média entre 480 e 500 Da, com número de carbonos (a 5% do ponto de destilação) ≥ 25 ; os de Classe II são os de massa molecular média entre 400 e 480 Da com número de carbonos (a 5% do ponto de destilação) ≥ 22 ; por fim, os de Classe III são os de massa molecular média entre 300 e 400 Da com número de carbonos (a 5% do ponto de destilação) ≥ 17 (BIEDERMANN; GROB, 2010; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002).

O JECFA havia estabelecido, em 2002, uma ingestão diária aceitável temporária (IDA) de 0,01 mg / kg de peso corporal para óleos minerais das Classes II e III, livres de MOAH. Os MOSH correspondentes aos óleos das Classes II e III são os mais frequentemente detectados nos alimentos. Para óleos de Classe I, foi estabelecida uma IDA de 10 mg / kg de peso corporal (WHO, 2002).

Em 2009, o Instituto Federal Alemão de Avaliação de Riscos (BfR) avaliou as conclusões sobre a transferência de MOH de embalagens de cartão reciclado para alimentos a qual foi atribuída ao uso de jornais em reciclagem (BfR, 2009). Os MOH tinham comprimentos de cadeia de até C25 e continham 10 - 25% de MOAH. O BfR concluiu que, devido: 1) a elevada fração de MOAH e a possível existência de substâncias carcinogênicas nesta fração; 2) a alta taxa de transferência de MOH para alimentos; 3) a acumulação de MOH em tecidos humanos; 4) a IDA temporária de grupo do JECFA de 0,01 mg / kg p.c. para óleos minerais de classe II e III de viscosidade baixa e intermédia, livres de MOAH (WHO, 2002) - havia uma necessidade urgente de minimizar a transferência de óleos minerais de embalagens de cartão reciclado para os alimentos.

3.3. Classes de MOH relevantes para a segurança de alimentos

O óleo mineral consiste em misturas complexas de hidrocarbonetos, principalmente saturados como as parafinas (alcanos de cadeia linear ou ramificada) e os naftenos (alcanos saturados cíclicos), coletivamente

classificados como hidrocarbonetos saturados de óleo mineral (MOSH), e hidrocarbonetos aromáticos de óleo mineral (MOAH), que são 97-99% alquilados e consistem num número enorme de componentes (BIEDERMANN; FISELIER; GROB, 2009).

O termo alcano é usado para se referir tanto as parafinas quanto aos naftenos. O termo MOH exclui os hidrocarbonetos que ocorrem naturalmente nos alimentos (principalmente n-alcenos com números ímpares de carbonos, de C23 a C35, e hidrocarbonetos de origem terpênica) e hidrocarbonetos oligoméricos liberados a partir de poliolefinas (constituídas em grande parte por alcenos ramificados) (EFSA, 2012).

A EFSA, 2012 identifica três classes principais de compostos de MOH relevantes para a segurança de alimentos:

Alcenos, ramificados e não ramificados (parafinas);

Ciclo-alcenos, principalmente ciclo-pentanos e ciclo-hexanos, alquilados e não alquilados, sistemas com um, dois ou mais anéis saturados (naftenos);

Aromáticos, sistemas com um, dois ou mais anéis aromáticos, incluindo alquil-substituídos.

3.4. Dados toxicológicos de MOH

Ingestão, exposição dérmica e inalação são as vias de exposição mais estudadas para os MOSH e MOAH (EFSA, 2012; PURCARO; BARP; MORET, 2016).

Os óleos minerais obtidos de produtos petrolíferos não refinados (óleos para motores, óleos hidráulicos, etc.) podem conter grandes quantidades de hidrocarbonetos aromáticos (principalmente alquilados) e por isso são classificados como carcinogênicos para humanos (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1987). Sendo assim, a toxicidade do óleo mineral depende da distribuição molecular de hidrocarbonetos e da presença de MOAH, que representam a fração mais tóxica. Um estudo recente sobre MOH em tintas de impressão relatou um efeito xenoestrogênico e genotóxico, juntamente com uma potencial atividade disruptora endócrina, principalmente

devido à fração aromática (TARNOW et al., 2016). Já a toxicidade de MOSH é controversa, porém o fato de elas tenderem a se acumular nos tecidos em quantidades que estão inversamente relacionadas ao comprimento de sua cadeia de carbono é bem conhecido (SCOTTER et al., 2003; CONCIN et al., 2008; PURCARO; BARP; MORET, 2016).

Na opinião sobre MOH em alimentos, publicada pela EFSA em 2012, os MOAH foram considerados mais tóxicos do que os MOSH, devido à presença dos anéis de benzeno. Os MOAH com três ou mais anéis aromáticos alquilados ou pouco alquilados podem ser mutagênicos e carcinogênicos e, portanto, são potencialmente preocupantes. Os MOSH de C16 a C35 podem se acumular em vários tecidos, incluindo adiposo, linfonodos, baço e fígado, e causar micro granulomas, que são gotas contendo MOSH cercado por proteínas (BARP et al., 2014). Não foram indicados valores de ingestão diária tolerável (IDT) para MOAH, uma vez que nenhuma dose segura pode ser definida para compostos genotóxicos, e nem para MOSH devido a dados insuficientes, particularmente no que diz respeito à acumulação. A exposição estimada variou de 0,03 a 0,3 mg de hidrocarbonetos saturados (MOSH) por quilograma de peso corporal com a alimentação diária. Isto significa que um adulto de 60 kg de peso corporal pode ser exposto a 18 mg de MOSH por dia, totalizando até 6,6 g por ano, já as crianças podem estar mais expostas à esta ingestão. A ingestão de hidrocarbonetos aromáticos (MOAH) é estimada pela EFSA como sendo de cerca de 20% dos valores de MOSH, isto é, entre 0,005 e 0,06 mg por kg de peso corporal (EFSA, 2012; BARP et al., 2014; JAMNICKI et al., 2015).

Até então as avaliações toxicológicas haviam sido baseadas em estudos de 90 dias com ratos Fischer 344 (GROB, 2014). Para os óleos especificados como classes II e III (WHO, 2002), a formação de granulomas (ou micro granulomas) foi observada em doses elevadas. Nos linfonodos mesentéricos (MLN) de ratos, esses granulomas às vezes chegaram a causar inflamações. Foi argumentado que tais inflamações não foram observadas em outras cepas de ratos nem em outras espécies e que a formação de granulomas não era específica, adaptativa e nem progrediu para efeitos patológicos mais severos. Em experiências análogas, não se observou formação de granuloma ou outro efeito para os óleos minerais de Classe I. O uso de dados obtidos através de

experiências com animais para a avaliação da segurança humana enfrenta incertezas. Entre outras diferenças, os testes em animais duram muito menos tempo do que a vida humana e, portanto, a acumulação não é devidamente refletida. Além disso, em nenhum dos testes com animais foi atingida, no tecido, uma concentração em estado estacionário para MOSH. Também é desconhecido se a formação de granulomas é meramente determinada pela concentração de MOSH em um tecido e/ou se é devida a outros fatores (BARP et al., 2014).

Os óleos minerais presentes em cartão reciclado e tintas de impressão são tipicamente centrados entre C18 e C23 e, assim, caem em classes para as quais o JECFA estabeleceu uma ingestão diária aceitável (IDA) de 0,01 mg / kg de peso corporal (BIEDERMANN; GROB, 2010; WHO, 2002). Usando convenções geralmente aplicadas, isto é, para 60 kg de peso corporal humano e 1 kg de alimento contaminado com uma dada substância, sendo consumido diariamente, o limite de migração específica para estes óleos seria 0,6 mg / kg de alimento. Esta avaliação pressupõe óleos encontrados em cartão reciclado que, em geral, contêm de 15 a 25% de compostos aromáticos, predominantemente com 1 a 3 anéis aromáticos como demonstrado por Biedermann e Grob (2010), em análises bidimensionais CG-CG.

A absorção de alcanos pode ocorrer através do sistema linfático. Para n- e ciclo-alcanos a absorção varia de 90% para C14-C18 a 25% para C26-C29. A absorção diminui ainda mais com o aumento do número de carbonos, até acima de C35 quando é desprezível. Dados limitados sugerem que os ciclo-alcanos são absorvidos em níveis semelhantes aos n-alcanos de peso molecular comparável, enquanto a absorção de alcanos ramificados é ligeiramente menor. Os alcanos são inicialmente oxidados em seus álcoois graxos correspondentes pelo sistema citocromo P450, subsequentemente biotransformados em ácidos graxos e, em alguns casos, sujeitos à via de oxidação β -normal. Esta reação é mais rápida para n-alcanos do que para alcanos ramificados e ciclo-alcanos. Devido a baixas taxas de biotransformação, em particular para alguns alcanos ramificados e ciclo-alcanos, MOSH com número de átomos de carbono entre 16 e 35 podem acumular em diferentes tecidos, incluindo tecido adiposo, gânglios linfáticos, baço e fígado. Embora existam informações limitadas sobre a

toxicocinética de MOAH, os dados disponíveis indicam que estes compostos são bem absorvidos e rapidamente distribuídos em todos os órgãos. Os dados também indicam que os MOAH são extensivamente metabolizados e não bioacumulam. A concentração de MOSH em tecidos humanos (principalmente nódulos linfáticos, fígado, baço e tecido adiposo) demonstra que a acumulação destes compostos, principalmente os ramificados e ciclo-alcenos, ocorre em seres humanos (EFSA, 2012).

Todos os MOH são mutagênicos a menos que sejam tratados especificamente para remover os MOAH. A mutagenicidade do MOH é causada principalmente por MOAH de 3-7 anéis, incluindo HPA's que são não-alquilados. Estes HPA's são formados principalmente pelo aquecimento do óleo, e consistem numa fração menor de MOAH. Muitos MOAH com três ou mais anéis aromáticos e pouca ou nenhuma alquilação, e análogos contendo heterocíclicos, podem ser ativados por enzimas P450 em carcinogênicos genotóxicos quimicamente reativos. MOSH não são carcinogênicos, embora os MOSH de cadeia longa possam atuar como promotores de tumores em doses elevadas. Alguns MOAH altamente alquilados podem também atuar como promotores de tumores, mas eles próprios não são carcinogênicos. Alguns MOAH simples, como o naftaleno, são carcinogênicos por um modo de ação não genotóxico, envolvendo citotoxicidade e regeneração proliferativa (EFSA, 2012).

Barp et al. (2014) realizaram uma pesquisa na qual foram determinados os hidrocarbonetos de óleo mineral em tecido adiposo subcutâneo, linfonodos mesentéricos (MLN), baço, fígado e pulmão coletados de 37 indivíduos com idade entre 25 e 91 anos (média 67 anos), sendo 11 do sexo feminino e 26 do sexo masculino, durante a autópsia na Universidade Médica de Viena. A partir de 14 desses indivíduos, 5 do sexo feminino e 9 do sexo masculino, também foram coletados tecidos cerebrais, cardíacos e renais. Não foram detectados hidrocarbonetos aromáticos de óleo mineral (MOAH). A concentração média de hidrocarbonetos saturados de óleo mineral (MOSH) foi de 223 mg / kg nos linfonodos mesentéricos, 131 mg / kg no fígado, 130 mg / kg em tecido adiposo, 93 mg / kg no baço e 12 mg / kg nos pulmões. Em rim, coração e cérebro as concentrações médias de MOSH foram insignificantes. Os máximos, encontrados em MLN e baço, foram 1390 e 1400 mg / kg, respectivamente. Um

quarto dos indivíduos apresentou uma quantidade total de MOSH no corpo acima de 5 g e as concentrações em órgãos ativos (baço e MLN) atingiram 1,4 g / kg. Estes resultados mostram que as concentrações de MOSH nos tecidos humanos são muito superiores às extrapoladas a partir de experiências com animais e de exposição estimada, possivelmente devido à maior exposição e forte acumulação de alguns constituintes dos MOSH. De fato, as concentrações se aproximam das dos animais expostos à dose mais alta, indicando que quase não há margem de segurança. Apesar desse resultado não ser necessariamente um indicativo de problema de saúde, uma avaliação toxicológica cuidadosa mostra-se necessária.

A avaliação toxicológica atual de vários tipos de MOSH baseia-se principalmente em intervalos de massa molecular (aproximados pelos tempos de retenção em CG).

3.5. Legislação

Atualmente não há limites legais no Brasil e no mundo para o conteúdo de óleos minerais, tanto em embalagens como em alimentos. Os limites temporários da Europa para os óleos minerais brancos descritos nas recomendações do BfR baseiam-se na acumulação nos tecidos.

Como os MOSH de intervalo de número de carbonos variando de C10 a C16 (essencialmente solventes) não são acumulados no corpo humano, possivelmente devido à sua volatilidade, o Instituto Federal Alemão de Avaliação de Risco (BfR) estabeleceu, em 2011, um limite temporário de 12 mg/kg de alimento para estes. Em 2012, o BfR adicionou um limite de 4 mg/kg para MOSH variando de C17 a C20 referente a acumulação insignificante em fígado de rato o que também se aplica ao fígado humano, mas não a outros tecidos humanos (BARP et al., 2014; GROB, 2014).

Em junho de 2012, a EFSA publicou uma Opinião sobre os MOH em alimentos considerando os valores de ingestão diária aceitável (IDA), previamente estabelecidos, pelo Comitê Conjunto de Especialistas da FAO / OMS sobre Aditivos Alimentares (JECFA) como válidos (EFSA, 2012). Após esta publicação, o JECFA retirou a IDA temporária de 0,01 mg/kg p.c. para as classes

II e III de óleos minerais isentos de MOAH especificados em 2002 (WHO, 2002; WHO, 2012), dos quais foi proposto um limite de 0,6 mg/kg para MOSH e 0,15 mg/kg para MOAH em alimentos (PURCARO; BARP; MORET, 2016).

Em maio de 2013, o Ministério Alemão de Nutrição, Agricultura e Proteção ao Consumidor (BMELV) publicou uma proposta que visava regulamentar os contaminantes de óleo mineral em papel e materiais para contato com alimentos, sugerindo que não deveria haver migração de MOH de C10-C25 do papel para os alimentos (PURCARO; BARP; MORET, 2016). Em julho de 2014, um novo projeto de lei estabeleceu limites máximos para resíduos de óleo mineral em embalagens de alimentos feitas de papel, cartão ou papelão de fibras recicladas. Estabeleceu-se limites máximos para MOSH (24 mg/kg) e para MOAH (6 mg/kg) na faixa C16–C25 para contato com alimentos secos e não oleosos ou C16–C35 para contato com alimentos úmidos. Quando os limites máximos nos materiais de embalagem são excedidos, uma embalagem ainda pode ser aprovada se os valores de migração para alimentos não excederem 2 mg/kg para MOSH C20–C35 e 0,5 mg/kg para MOAH C16–C35 (BMELV, 2014; PURCARO; BARP; MORET, 2016).

3.6. Métodos Analíticos de Determinação de MOH

3.6.1. Óleos Minerais

Os óleos minerais são misturas complexas de MOSH e MOAH, que não podem ser separadas individualmente como picos únicos, por isso não é possível definir padrões certificados de aplicabilidade geral. Contudo, é possível quantificar a concentração de frações totais de MOSH e de MOAH, bem como certas subclasses, utilizando métodos baseados em cromatografia gasosa (CG) com detecção por ionização de chama (FID). A contaminação por MOSH é facilmente reconhecível pela presença no traçado cromatográfico de uma ou mais "corcovas" ("*humps*") consistindo de um grande número de picos não resolvidos e / ou n-alcenos com uma distribuição equilibrada entre hidrocarbonetos de números pares e ímpares de carbono. A GC também permite a caracterização dos produtos de MOH por faixa de massa molecular. A presença de n-alcenos endógenos dificulta um pouco a determinação de MOSH, porém esses hidrocarbonetos podem ser facilmente reconhecidos pelo seu

padrão típico de picos agudos, no topo da corcova da fração MOSH, que consistem em hidrocarbonetos de número ímpar de carbonos. Para quantificar a fração MOSH, é necessário subtrair a área dos n-alcanos endógenos da área total (corcova mais n-alcanos). Também os MOAH formam uma ou mais corcovas de picos não resolvidos com a mesma faixa de volatilidade que os MOSH, indicando que eles são originários da mesma fração MOH obtida de um processo de destilação (EFSA, 2012; PURCARO; BARP; MORET, 2016).

A CG é a técnica de separação escolhida porque permite a distinção entre os MOH e os hidrocarbonetos que ocorrem naturalmente nos alimentos. Ela permite a caracterização dos produtos de óleo mineral por faixa de massa molecular, bem como a presença ou ausência de n-alcanos, mas está muito longe de alcançar a resolução em substâncias individuais. É potencialmente a técnica usada para determinar a soma de MOSH e MOAH, com faixas de massas moleculares especificadas (BIEDERMANN; FISELIER; GROB, 2009; EFSA, 2012). Geralmente são utilizadas colunas curtas com filmes finos de fase estacionária apolar.

O detector de ionização de chama (FID) é o detector escolhido na análise de MOH, pois fornece uma resposta virtualmente igual por unidade de massa para todos os hidrocarbonetos, evitando os problemas de calibração encontrados na espectrometria de massas (EM). Porém, o FID não é seletivo e tem modesta sensibilidade, que são sérios inconvenientes em vista dos padrões amplos de picos não resolvidos de componentes não identificados formados por componentes de óleo mineral (BIEDERMANN; FISELIER; GROB, 2009). Sua falta de sensibilidade e seletividade deve ser compensada com uma pré-separação adequada para garantir que apenas os MOSH ou os MOAH atinjam o detector.

A determinação analítica de MOH frequentemente inclui uma etapa de extração seguida por uma etapa de purificação para isolar hidrocarbonetos da gordura (quando presente) e para fracionar os MOSH e os MOAH, que de outra forma co-eluiriam na coluna de GC. A separação MOSH / MOAH pode ser realizada on-line (em uma coluna LC) ou off-line (em uma coluna LC, um cartucho SPE de extração em fase sólida ou em uma coluna de vidro maior

preenchida com um sorvente). O LC-GC on-line tem as vantagens de explorar alta eficiência de separação, permitindo alta taxa de transferência de amostras, reduzindo o consumo de solventes, a manipulação da amostra e a perda de padrões internos (P.I) quantificadores das frações MOSH e MOAH, e aumentando a reprodutibilidade do método. Por outro lado, a sensibilidade é limitada pela capacidade da coluna LC e são necessários operadores qualificados e instrumentação adequada (PURCARO; BARP; MORET, 2016).

Uma grande parte da análise de MOH foi conseguida por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada em linha-GC-FID com colunas de 25 cm x 2 mm de diâmetro interno, e a transferência de frações de HPLC completas (300-500 µL) em CG foi conseguida por técnicas de evaporação especialmente concebidas. Até 2009, devido às dificuldades com a análise de MOAH, as aplicações em óleos minerais consideravam a determinação apenas da fração MOSH (muitas vezes sem separação controlada entre os MOSH e os MOAH).

A sílica gel utilizada em HPLC proporciona uma separação completa entre MOSH e MOAH desde que o eluente utilizado, hexano ou pentano, esteja isento de impurezas polares (BIEDERMANN; FISELIER; GROB, 2009). As parafinas e os naftenos são separados pelo menos parcialmente, mas o método não foi elaborado para esta separação. A separação crítica é entre os naftenos de vários anéis (MOSH) e os benzenos altamente alquilados (MOAH) (EFSA, 2012).

As revisões sobre a HPLC acoplada em linha-GC-FID foram publicadas por Biedermann e Grob. (2012) que determinaram na amostra de arroz embalado diretamente em uma caixa de papel cartão impressa, consistindo em grande parte de fibras recicladas (1 kg de arroz em uma caixa de 45 g), a concentração de MOSH e MOAH até C24 e obtiveram 105 e 26 mg /kg de arroz, respectivamente. On-line HPLC-GC-FID proporciona maior sensibilidade, é automatizado, evita, como já citado, manipulações que podem introduzir contaminantes e reduzir a perda de P.I quantificadores das frações e seus limites de detecção geralmente variam de 0,1 a 2,5 mg/kg, dependendo do teor de gordura da amostra, mas a instrumentação correspondente está disponível apenas em alguns laboratórios.

A cromatografia líquida (CL) pode separar os MOH em parafinas, naftenos e aromáticos, mas uma vez que não existe um detector adequado, é apenas utilizada para a pré-separação antes da análise por CG para obter as seguintes separações (EFSA, 2012):

1. Isolamento dos MOH a partir da matriz da amostra;
2. Separação entre MOSH e MOAH, possivelmente também entre as parafinas e os naftenos.

3.6.2. Preparo de Amostras Sólidas

A obtenção de dados qualitativos e/ou quantitativos a respeito de um ou mais componentes de uma amostra é o objetivo de um estudo analítico. A amostra pode ser um sólido, líquido ou um gás e, dependendo do grau de sofisticação e informação obtida com os equipamentos disponíveis para análise, deve ser realizado algum tipo de tratamento antes da introdução da amostra no equipamento analítico. Frequentemente, muitas etapas devem ser empregadas até que uma alíquota da amostra seja introduzida no cromatógrafo para a análise. A finalidade do preparo da amostra é adequar o soluto a ser determinado às condições da técnica e do método a serem utilizados.

Várias operações podem ser necessárias dependendo da natureza da amostra, da matriz e da concentração dos analitos a serem determinados. As operações geralmente envolvidas no preparo da amostra para análise cromatográfica são: redução de tamanho e homogeneização, extração, concentração ou diluição e limpeza (clean-up). O preparo da amostra é uma das etapas mais críticas em uma análise porque envolve maior tempo e cuidado do analista (LANÇAS, 2009).

A remoção do analito da matriz original, transferindo-o para um solvente apropriado (para sua determinação) denominada extração, é uma das operações mais importantes do preparo da amostra. A extração líquido-sólido surgiu, inicialmente, como uma técnica que visava a miniaturização da LC no preparo de amostra, permitindo o desenvolvimento da extração em fase sólida (SPE, solid phase extraction) em meados da década de 1970 (LANÇAS, 2004; LANÇAS 2009).

A SPE é uma técnica de separação líquido-sólido, baseada nos mecanismos de separação da cromatografia líquida de baixa pressão, também conhecida como cromatografia líquida clássica. Basicamente, a SPE na sua forma mais simples e conhecida comporta-se como uma cromatografia líquida empregando-se uma pequena coluna aberta, usualmente denominada de cartucho de extração, que contém a fase sólida (fase estacionária em cromatografia, que pode ser a sílica gel, por exemplo). A solução contendo o analito de interesse é introduzida no topo superior do cartucho e penetra-o por ação da gravidade. Após toda fase líquida ser eliminada, o analito retido no cartucho é eluído com um pequeno volume de solvente (ou mistura de solventes) de forma a coletá-lo em uma concentração já apropriada para análise (LANÇAS, 2004), porém pode ser necessária uma etapa de concentração (enriquecimento) da amostra por meio de rota-*evaporação* de solvente.

As principais etapas empregadas em SPE visando o isolamento de um composto (ou classe de compostos) são: Condicionamento do cartucho com solvente adequado, adição de uma alíquota do extrato da amostra, lavagem (descarte de volume morto) e eluição (obtenção dos compostos de interesse). Dependendo do modo de operação (objetivo da SPE) podem ocorrer pequenas adaptações/modificações nas etapas envolvidas.

Um dos principais modos de operação em SPE é o isolamento de matriz cujo objetivo é reter, na fase sólida, os interferentes da matriz, em vez do analito de interesse que passa direto com o solvente da amostra. O analito é coletado em um frasco adequado e os interferentes são retidos na fase sólida do cartucho, que posteriormente é descartada apropriadamente. Este procedimento é, geralmente, utilizado para *clean-up* e não para a concentração de amostras (LANÇAS, 2009).

A adsorção é um dos principais mecanismos envolvidos na SPE. A modalidade de cromatografia líquido-sólido (adsorção) consiste em uma coluna recheada com um sólido (fase estacionária, ou fase sólida em SPE) e uma fase móvel líquida, onde a sorção isotérmica (adsorção) refere-se a um aumento da concentração do soluto (que está em excesso na fase móvel), entre as

superfícies das fases móvel e estacionária (ou sólida) (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Dentre os adsorventes mais empregados a sílica gel é o mais comum, sendo utilizado para propósitos gerais. A sílica gel possui uma superfície ligeiramente ácida o que permite a retenção de compostos básicos. Um dos problemas com o uso da sílica em SPE é o fato de este adsorvente adsorver facilmente água proveniente do ambiente do laboratório ou de solventes, pela formação de ligações de hidrogênio com os grupos silanóis. Assim, a superfície da sílica fica recoberta com moléculas de água e os sítios em que ocorre este fenômeno não estarão disponíveis para a adsorção. Por isso, os adsorventes, como a sílica gel, são aquecidos para a dessorção de água (ativação) e de outros materiais adsorvidos. Para a maioria dos sólidos adsorventes um aquecimento ao redor de 200 °C durante duas horas é suficiente (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; LANÇAS, 2009).

Após ter sido escolhido o adsorvente, os eluentes são selecionados de acordo com o seu poder eluente, ou seja, de acordo com sua habilidade de dessorver do adsorvente as substâncias (adsorvatos) nele adsorvidas. Com fases estacionárias polares, como a sílica gel, a dessorção é facilitada se utilizar um eluente polar e é dificultada quando se usa um eluente de polaridade menor, ou seja, um adsorvato ficará mais retido no adsorvente se o eluente em uso for pouco polar (a não ser que o adsorvato em questão seja pouco polar). (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Ao passar através do adsorvente na coluna, a fase móvel arrasta consigo os componentes da amostra que está sendo separada por SPE. A velocidade de movimento descendente de um componente depende de sua adsorção pela fase sólida, isto é, quanto mais fracamente o componente estiver adsorvido, mais rápida será sua passagem pela coluna (cartucho), e vice-versa. Essa separação entre os componentes de uma mistura ocorre devido às diferenças nas forças de adsorção (forças de dispersão, dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido e ligação de hidrogênio) entre eles e o adsorvente. Para que ocorra uma separação completa a fase móvel deve ser fracamente adsorvida pela fase estacionária, não ser

afetada quimicamente e possibilitar de fato o desenvolvimento de uma corrida cromatográfica, ocasionado por um determinado grau de adsorção.

Se a separação estiver sendo feita no modo de fase normal, com fase sólida polar, como a sílica gel, um aumento na polaridade da fase móvel resultará na eluição mais rápida dos componentes da mistura. Pode-se conseguir este aumento de polaridade da fase móvel alterando-se o solvente por outro mais polar, ou aumentando a proporção do solvente mais polar quando se empregar uma mistura de dois ou mais solventes (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). Dos eluentes com baixo ponto de ebulição utilizados no procedimento de SPE do método do BfR (2012) temos o eluente A que é o n-hexano e o eluente B que é uma mistura de n-hexano/diclorometano/tolueno (na proporção em volume de 75:20:5), sendo que a ordem crescente de polaridade desses solventes é: n-hexano < tolueno < diclorometano.

Como os MOH são contaminantes lipofílicos solúveis em solventes apolares, a extração da amostra deve ter como objetivo retirar os hidrocarbonetos contaminantes da matriz sólida e transferi-los para um solvente apolar de baixo ponto de ebulição, como o n-hexano, para maior purificação e concentração antes da determinação por GC-FID. Uma mistura de n-hexano/etanol (1:1, v/v) explora bem o poder de extração do n-hexano para hidrocarbonetos (PURCARO; BARP; MORET, 2016).

O primeiro passo da análise de MOSH e MOAH é a obtenção de uma solução apropriada para cromatografia gasosa. Em casos simples, como para matérias-primas ou produtos alimentícios secos, uma extração com n-hexano é suficiente, já para matrizes complexas como alimentos gordurosos, uma limpeza eficiente da amostra se faz necessária para reduzir os possíveis efeitos de compostos interferentes. Dependendo da preparação de amostra utilizada, diferentes fatores devem ser levados em consideração, por exemplo, a obtenção da extração completa de um produto seco depende de sua permeabilidade e de sua dispersão para sofrer turgescência com o n-hexano. Biedermann e Grob. (2012) publicaram as diferenças detalhadas na preparação da amostra de alimentos secos, matrizes úmidas, matrizes gordurosas, papelão, filmes plásticos e tintas de impressão.

A importância da etapa de preparação da amostra na análise de MOSH e MOAH é muito grande: o método LC-GC-FID fornece apenas corcovas ("humps") irregulares de compostos não resolvidos. É preciso muita experiência para interpretar corretamente as corcovas de MOSH e MOAH e reconhecer potenciais resultados falso-positivos pela eluição simultânea de material interferente da matriz da amostra, caso a limpeza da mesma tiver sido incompleta. Tais grupos interferentes podem ser, por exemplo:

1. N-alcanos que estão naturalmente presentes em materiais vegetais ou alimentos. Eles consistem predominantemente de n-alcanos com números ímpares de carbono (na faixa de C23-C35) e formam picos isolados bem formados. Em grandes quantidades, eles podem sobrecarregar o GC fazendo com que a detecção de MOSH não seja mais possível (EFSA, 2012; BIEDERMANN; GROB, 2012 a, b).

2. Hidrocarbonetos saturados oligoméricos de poliolefina (POSH). Eles estão presentes em alguns materiais usados para contato com alimentos. Eles podem ser usados em sacos de plástico, filmes, camadas seláveis por calor (por exemplo, em sacos de alumínio). Os POSH eluem na separação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), ou na extração em fase sólida (SPE), na fração MOSH porque eles consistem em grande parte de hidrocarbonetos ramificados. Na maioria dos casos, é possível distinguir entre MOSH e POSH por suas propriedades cromatográficas, conforme descrito por Biedermann-Brem et al (2012).

3. Olefinas tais como esqualeno, seus produtos de isomerização, esterenos, carotenóides, terpenos e outros. Por causa de sua grande largura de banda polar, eles são eluídos na fração MOSH ou MOAH (EFSA, 2012; BIEDERMANN; GROB, 2012 a, b).

4. Lipídios (por exemplo, triglicérides) eluem depois da fração MOAH, mas uma quantidade enorme pode sobrecarregar a coluna LC e reduzir a capacidade da fase estacionária para a separação MOSH e MOAH (EFSA, 2012; BIEDERMANN; GROB, 2012 a, b).

Uma das fases estacionárias mais empregadas em cromatografia em fase líquida para o isolamento e a purificação de substâncias orgânicas de baixa ou média polaridade é a sílica gel. O aumento seletivo do poder de resolução deste adsorvente pela adição de impregnantes/aditivos à sílica pode contornar uma eventual dificuldade na resolução de uma mistura mais complexa. Neste contexto o uso de aditivos como íons prata (Ag^+) tem se mostrado muito útil na separação de compostos orgânicos insaturados. A técnica tem sido importante para a separação e/ou purificação de triterpenos, esteroides, triglicerídeos, lipídeos, feromônios e na resolução de misturas de terpenos com estruturas muito semelhantes (ANDREÃO et al., 2010).

A capacidade de retenção da fase de sílica para triglicerídeos depende da polaridade do solvente. Grob et al. (2005) publicaram que a fase móvel reduz a capacidade de retenção de triglicerídeos da fase de sílica pela adição de um modificador polar (ou menos apolar, diclorometano), usado para facilitar a eluição dos MOAH, ao n-hexano usado como fase móvel, (GROB; KAELIN; ARTHO, 2005). Para etapas de purificação manual com foco na fração MOAH, a purificação por extração em fase sólida (SPE, Solid Phase Extraction) com sílica gel ativada ajuda a reter os triglicerídeos (GRUNDBÖCK et al., 2010).

Os fenômenos envolvidos nas interações que regem a diferença de afinidades entre os analitos e os íons Ag^+ impregnados na fase estacionária de sílica gel são, em ordem crescente de prioridade, os seguintes: a formação de complexos com ligações insaturadas, interações com grupos funcionais polares que contêm hetero-átomos hidrogenados (OH , NH_2 e CO_2H), e interações com outros grupos polares. No caso das ligações múltiplas entre átomos de carbono, fatores como a conjugação, densidade eletrônica e impedimento estéreo são importantes na interação do analito com a fase estacionária (fase sólida em SPE). Compostos com ligações múltiplas conjugadas e com maior densidade eletrônica nestas ligações tendem a formar os complexos mais estáveis e, portanto, a possuir maior afinidade pela fase estacionária, tendo assim um maior tempo de retenção na coluna. Complementarmente, os compostos com ligações múltiplas isoladas, e que possuem maior restrição estérea e menor densidade eletrônica, tendem a ser menos retidos que os primeiros (ANDREÃO et al., 2010).

Uma técnica amplamente aplicada desde a década de 1960 para facilitar a separação de compostos orgânicos (como os MOH) é o uso de nitrato de prata como suporte de cromatografia. O princípio fundamental do uso de sílica gel impregnada com íons Ag^+ para separar MOSH de MOAH é baseado no fato de o íon de prata (Ag^+) agir como um aceptor de elétrons π e se ligar a um doador de elétrons π contido dentro das moléculas a serem separadas formando complexos polares de forma reversível, e aquelas moléculas que não contêm um doador π (ou as que possuem menos doadores π) eluirão mais rápido, proporcionando uma separação que de outro modo seria inatingível (por exemplo, a separação entre um alcano e um alceno) (MANDER; WILLIAMS, 2016).

Assim, como as ligações duplas de porções alifáticas e aromáticas podem fornecer elétrons π para os íons de prata, aquelas moléculas com ligações duplas, tais como olefinas, lipídios insaturados e contaminantes MOAH irão se complexar com a prata. Por outro lado, os MOSH que não contêm doadores de elétrons irão eluir mais rápido. Além disso, a sílica gel possui polaridade apreciável e absorve triglicerídeos substancialmente. Os MOSH com propriedade não polar também são eluídos com a fase móvel (n-hexano, principalmente). Portanto, a retenção de sílica gel ativada/ Ag^+ é a complexação de íons prata com as ligações duplas e a interação da sílica gel com os lipídios (LI et al., 2016), o que ajuda na purificação das frações MOSH e MOAH das amostras.

3.6.3. Determinação Analítica

Técnicas de Infravermelho (IV)

Por muitos anos a espectroscopia de infravermelho (IV) foi usada para medir a quantidade de óleo na água. Os métodos baseados em IV têm como vantagens a simplicidade, rapidez e o menor custo, mas não são capazes de fornecer informações sobre o tipo de contaminação por hidrocarbonetos. Alcanos, cicloalcanos e arenos têm sensibilidades bastante diferentes na determinação por espectrometria de infravermelho, levando a alta incerteza relativa para os contaminantes em águas naturais e residuais. Outra fonte de incerteza é a incompatibilidade da composição da mistura de hidrocarbonetos na

amostra e na substância padrão usada para calibração unidimensional (PURCARO; BARP; MORET, 2016).

Técnicas de Cromatografia Líquida e Cromatografia Gasosa (LC-GC) on-line para determinação de MOSH e MOAH

O método mais adequado para determinação rápida de óleos minerais em diferentes alimentos é a LC-GC on-line. Esse método tem sido amplamente utilizado para análise de hidrocarbonetos saturados e só recentemente foi aplicado para análises de rotina de MOSH e MOAH. A escolha da interface depende da necessidade de evitar perdas de voláteis e da dimensão da fração que precisa ser transferida (sensibilidade necessária) (PURCARO; BARP; MORET, 2016).

Lorenzini et al. (2010) desenvolveram um método para a extração de MOSH e MOAH a partir de papel-cartão, com base na extração clássica de solventes (SE). De acordo com este método, o óleo mineral do papel-cartão é extraído com uma mistura de hexano / etanol (1:1 v/v), capaz de assegurar bons rendimentos de extração e uma limitada extração de materiais de alto ponto de ebulição que perturbam a análise de CG. O etanol é então separado pela adição de uma quantidade apropriada de água, e a fase de hexano é usada para análise num equipamento HPLC-GC-FID on-line.

No total, caixas de papel-cartão de 102 produtos foram amostradas dos mercados suíço e italiano, sendo 66 em cartão constituído, principalmente, de fibras recicladas e 36 em cartão constituído de fibras virgens (de polpa química ou mecânica). Os cartões impressos foram analisados para MOSH e MOAH até o tempo de retenção de C24, uma vez que experimentos de evaporação mostraram que hidrocarbonetos eluídos até cerca de C24 são suficientemente voláteis para migração relevante em alimentos secos. Para a fração de MOSH (<C24) medida no cartão reciclado impresso, as concentrações variaram de 50 a 3800 mg/kg, com uma média de 626 mg/kg e uma mediana de 350 mg/kg. As concentrações de MOAH, não relatadas, relacionadas à soma de MOSH e MOAH contidos em óleo mineral variaram de 16% a 28% com média de 19%. Nove dos 36 cartões impressos constituídos de fibras virgens continham menos de 10 mg/kg de MOSH. No entanto, as concentrações atingiram até 1900 mg/kg

(mediana de 50 mg/kg). As concentrações de MOAH variaram de 5% a 22% com uma média de 15% (LORENZINI et al., 2010).

Moret et al. (2013) otimizaram um método de extração líquida pressurizada (PLE), seguido de análise por LC-GC-FID on-line, para determinação rápida de óleo mineral em papel e amostras de papel destinadas ao contato com alimentos. O método envolve extração com hexano e utiliza altas temperaturas e pressões para que a extração de analitos a partir de amostras sólidas seja rápida e eficiente, permitindo mínimo consumo de solvente e mínima manipulação da amostra. Os resultados obtidos com este método foram comparados com os obtidos pelo método utilizado por Lorenzini et al (2010) sendo, de fato, semelhantes. Um exemplo de comparação feita entre os resultados obtidos com extração líquida pressurizada (PLE) e extração clássica de solvente (SE) foi realizado com uma amostra de cartão reciclado não impresso, sendo para MOSH (C10-C35): 622 ± 22 mg/kg (PLE) e 643 ± 28 mg/kg (SE); para MOAH (C10-C35): 59 ± 3 mg/kg (PLE) e 64 ± 3 mg/kg (SE).

Flenger (2016) analisou os conteúdos de MOSH e MOAH em 30 sacos de pão coletados do mercado bávaro. A análise quantitativa foi feita usando HPLC-GC-FID on-line. Todos os sacos investigados continham substâncias de óleo mineral, sendo observado na fração de MOSH (\leq C35) até 416 mg / kg (média 180 mg / kg) e na fração de MOAH (\leq C35) até 45 mg / kg (média de 15 mg / kg).

Técnicas de SPE-GC-FID off-line para determinação de MOSH e MOAH

Vários métodos manuais para a pré-separação antes da análise por CG-FID estão em uso. Eles envolvem uma coluna de cromatografia líquida convencional (SPE) de uma dimensão usualmente determinada pela capacidade necessária para reter lipídeos. A sílica gel ativada proporciona maior capacidade para reter lipídios do que o óxido de alumínio e uma melhor separação entre os MOSH e olefinas interferentes, particularmente o esqualeno e seus produtos de isomerização. Em CL convencional com sílica gel ou óxido de alumínio, a separação entre MOSH e MOAH é incompleta. Isto pode ser melhorado com nitrato de prata. Os melhores resultados foram obtidos misturando-se sílica gel com uma pequena quantidade de nitrato de prata com sílica gel ativada e um

eluente contendo diclorometano/tolueno/n-hexano para a eluição da fração MOAH. A fraca sensibilidade obtida com o FID para os padrões amplos de picos não resolvidos formados pelo MOAH requer uma injeção de grande volume (LVI) em CG (cerca de 50 μ L), o que é possível pela técnica *on-column/retention gap*, por injeção *splitless* com recondensação de solvente concorrente ou técnicas de vaporização de temperaturas programadas (PTV) (EFSA, 2012).

Moret et al. (2012) utilizaram um método off-line de extração em fase sólida com grande volume de injeção, SPE com nitrato de prata/sílica gel, LVI (*Large Volume Injection*)-GC-FID, sendo esta uma alternativa válida para laboratórios que não possuem o equipamento on-line HPLC-GC-FID. Este método consistiu em uma coluna de vidro de 6 mL com sílica gel revestida com nitrato de prata a 10%. O sorvente seco foi acondicionado com hexano e, após o carregamento da amostra, a eluição foi primeiro realizada com hexano e depois com uma mistura de hexano/diclorometano (1:1, v/v). O primeiro 1 mL de eluato correspondente ao volume morto foi descartado. A fração MOSH foi eluída com 1,5 mL de hexano seguido por 0,5 mL da mistura hexano/diclorometano. A fração subsequente de 0,5 mL, livre de MOSH e MOAH, foi descartada. A fração MOAH eluiu com 7 mL de hexano/diclorometano. As frações eluídas foram concentradas antes de uma injeção de grande volume (LVI) no sistema GC.

O método foi utilizado para a determinação de hidrocarbonetos saturados e aromáticos de óleo mineral em amostra de papel cartão reciclado e em amostras selecionadas de alimentos secos geralmente comercializados em embalagens de papel cartão. A amostra de papel cartão reciclado continha 305 mg / kg de MOSH e 87 mg / kg de MOAH, abaixo de C24. O alimento mais contaminado foi uma amostra de chá preto (102,2 e 7,9 mg / kg), seguido de uma amostra de arroz (57,4 e 3,3 mg / kg) e açúcar em pó (8,6 e 0,9 mg / kg) de MOSH e MOAH abaixo de C25, respectivamente, todas embaladas em papel cartão com alguma porcentagem de material reciclado. Este método funciona bem para amostras de cartão e alimentos secos, mas dá interferência por ésteres de cera quando usado para amostras de óleos vegetais.

Um método manual que obteve um desempenho semelhante foi descrito por Fiselier et al (2013). Para explorar o maior poder de retenção da sílica ativada

em relação aos ésteres de cera, foi utilizado um leito misto (3 g) de sílica ativada / 0,3% de prata. A coluna de vidro, condicionada com 10 mL de hexano, foi carregada com a amostra (1 mL) e eluída primeiramente com hexano, dos quais 2 mL foram liberados e 4 mL foram coletados. Em seguida, uma mistura de hexano/diclorometano/tolueno (75:20:5; v/v/v) foi adicionada, recolhendo os primeiros 2 mL, que foram combinados com os 4 mL anteriores de hexano (obtendo uma fração MOSH de 6 mL), enquanto os outros 10 mL foram adicionados e coletados como uma fração MOAH.

Foi possível realizar uma separação robusta entre a fração MOSH e MOAH. A pequena quantidade de tolueno presente na mistura usada para eluir a fração MOAH diminuiu a retenção de aromáticos pela sílica com prata sem diminuir a retenção de ésteres de cera pela sílica ativada. O tolueno também foi adicionado à fração MOSH para facilitar a reconcentração e servir como detentor evitando a perda de voláteis durante a evaporação do solvente. Um volume de 50 µL foi injetado na coluna do GC-FID para atingir um limite de detecção para MOSH e MOAH abaixo de 1 mg / kg na maioria dos alimentos. O método deu resultados equivalentes ao método on-line.

Uma amostra de arroz contaminada a partir do contato com cartão reciclado (disponível no kit BfR para teste de desempenho do método) com aproximadamente 12 mg / kg de MOSH e 3 mg / kg de MOAH foi analisada pelo método manual e pelo método on-line HPLC-GC-FID. Os resultados obtidos mostraram uma boa concordância entre os dois métodos, sendo para o método manual: 14,2 e 3,1 mg / kg de MOSH e MOAH abaixo de C35, respectivamente; e para o método HPLC-GC-FID on-line: 13,9 e 2,6 mg / kg de MOSH e MOAH abaixo de C35, respectivamente. Comparação análoga foi feita para uma amostra de papel-cartão reciclado (também disponível no kit BfR), sendo para o método manual: 752 e 58 mg / kg de MOSH e MOAH abaixo de C35, respectivamente; E para o método HPLC-GC-FID on-line: 760 e 54 mg / kg de MOSH e MOAH abaixo de C35, respectivamente (FISELIER et al., 2013).

Jamnicki et al. (2015) realizaram um estudo com três grupos de papéis recuperados, os quais foram escolhidos levando-se em conta o tipo de papel e a técnica de impressão. Os papéis foram tratados em condições laboratoriais por

meio de dois métodos diferentes de remoção de tinta do papel destinado ao processo de reciclagem: remoção de tinta por flotação convencional (*flotation deinking*) e remoção de tinta por adsorção (*adsorption deinking*), que é um método inovador de remoção de tinta das aparas de papel, desenvolvido na Professorship for Paper Technology da Dresden University of Technology, cujo princípio de remoção baseia-se na capacidade de certos polímeros extraírem tinta e outros componentes hidrofóbicos da polpa. O objetivo do estudo foi comparar a eficiência dos dois métodos de remoção de tinta na redução de hidrocarbonetos de óleos minerais de classes específicas de papel reciclado.

A análise das concentrações de óleo mineral (MOSH e MOAH) na polpa, após a remoção da tinta de impressão pelos dois métodos, foi realizada por extração em fase sólida e GC-FID, conforme o método analítico desenvolvido pelo Laboratório Nacional de Referência Alemão para Materiais de Contacto com Alimentos do Instituto Federal de Avaliação de Risco (BfR), em cooperação com o Laboratório do Cantão de Zurique o qual baseia-se na análise por cromatografia gasosa dos hidrocarbonetos após pré-separação por cromatografia em coluna clássica (BfR, 2012).

Amostra de papel de jornal (ONP) foi uma combinação de três jornais impressos em offset usando tintas à base de óleo mineral. Para a amostra de papel supercalandrado (SC), foi utilizada uma mistura de duas revistas impressas por roto-gravura, enquanto um catálogo impresso em offset usando tintas *heatset* foi usado para a amostra de papel revestido leve (LWC).

Para cada amostra, a concentração da fração MOSH e MOAH foi calculada separadamente para os hidrocarbonetos eluídos na cromatografia gasosa antes de C24 e para os hidrocarbonetos eluídos após C24 até C35. O resumo dos resultados obtidos por Jamnicki et al (2015) estão no **Tabela 1**.

Tabela 1 – Resumo dos resultados obtidos por Jamnicki et al. (2015).

Amostra	Intervalo	Não Impresso	Sem Remoção de Tinta	Remoção por Adsorção	Remoção por Flotação
ONP	MOSH ≤ 35 (mg/kg)	387	952	371	457
	MOAH ≤ 35 (mg/kg)	129	479	180	248
SC	MOSH ≤ 35 (mg/kg)	114	650	68	144
	MOAH ≤ 35 (mg/kg)	51	97	60	47
LWC	MOSH ≤ 35 (mg/kg)	140	614	156	115
	MOAH ≤ 35 (mg/kg)	201	252	80	102

ONP: Amostra de papel de jornal; SC: Amostra de papel supercalandrado; LWC: Amostra de papel revestido leve.

O método de adsorção para remover a tinta do papel destinado à reciclagem pode ser visto, de modo geral, como um método mais eficiente para a redução do teor de óleo mineral da pasta de fibra (ONP) e (SC) do que o processo de flotação. No entanto, para LWC a redução de óleo mineral mostrou-se semelhante para as duas técnicas aplicadas na remoção de tinta.

Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente (GC x GC)

Segundo Purcaro, Barp e Moret (2016), a melhor técnica para uma caracterização detalhada de misturas complexas de hidrocarbonetos é a GC x GC, pois ela oferece alta sensibilidade (devido à reconcentração no final do primeiro processo de separação), um excelente poder de separação com uma exibição sistemática dos componentes nas plotagens. Contudo, a GC x GC não possibilita uma separação completa entre MOSH e MOAH, pois os hidrocarbonetos naftênicos (saturados cíclicos) são coeluídos com componentes aromáticos altamente alquilados. Em especial, hidrocarbonetos saturados de quatro e cinco anéis, tais como esteranos, hopanos e sesquiterpanos bicíclicos coeluem com os hidrocarbonetos aromáticos de dois e três anéis altamente alquilados. Por isso, a pré-separação por LC é um pré-requisito para a quantificação de MOAH (PURCARO; BARP; MORET, 2016).

Biedermann e Grob (2009) descreveram um método GC x GC para caracterização da fração MOAH por grau de alquilação e número de anéis após a pré-separação por LC. Compreendido por uma coluna de primeira dimensão

de 20 m x 0,25 mm de diâmetro interno (PS-255, 0,12 µm de espessura) e uma coluna de segunda dimensão de 1,5 m x 0,15 mm de diâmetro interno (50% de fenil-polisiloxano, 0,075 µm de espessura), o sistema GC x GC foi equipado com um modulador de jato criogênico e ligado a um MS quadrupolo para identificação e a um FID para quantificação em análise de rotina.

GC x GC geralmente é realizado com uma fase estacionária apolar na primeira coluna (separação por volatilidade) e com uma fase polar na segunda, mas o arranjo reverso mostrou-se ainda mais eficaz para certas aplicações, como resolução de MOSH (PURCARO; BARP; MORET, 2016). Biedermann e Grob (2015) conseguiram produzir gráficos nos quais era possível distinguir MOSH de polímeros de hidrocarbonetos oligoméricos saturados (POSH) e caracterizar o grau de refinação de um óleo mineral utilizando na primeira separação uma coluna de fenil-metil-polissiloxano e uma coluna de dimetil-polissiloxano a seguir.

Nenhum dos métodos atuais de análise para determinar o MOH nos alimentos foi formalmente validado. O painel CONTAM indica que padrões de referência certificados e materiais de referência para MOH precisam ser fornecidos para permitir o desenvolvimento de métodos de validação (Interlaboratoriais).

3.7. Fabricação de Papel e Cartão

O papel é formado por fibras celulósicas que se entrelaçam umas às outras, garantindo sua resistência. A principal matéria-prima para a obtenção industrial dessas fibras é a madeira, proveniente do tronco das árvores (SANTOS et al., 2001). As fibras podem ser de coníferas, que são consideradas madeiras macias (*softwood*) e possuem fibras longas (Ex. *Pinus* spp), ou de folhosas, que são consideradas madeiras duras (*hardwood*) e possuem fibras curtas (Ex. *Eucalyptus* spp).

A celulose é um polissacarídeo linear, constituído por um único tipo de unidade de açúcar, e é formada por unidades de monossacarídeos α -D-glucose, que se ligam entre si através dos carbonos 1 e 4, originando um polímero linear. Trata-se de um composto natural e um dos principais componentes das células

vegetais, que, por terem forma alongada e de pequeno diâmetro (finas), são normalmente chamadas de fibras (MACDONALD; FRANKLIN, 1969). A lignina, um polímero amorfo de composição química complexa que atua como um cimento ligando as fibras de celulose entre si e proporcionando rigidez à madeira, é outro componente encontrado nos vegetais. Os demais constituintes são denominados extrativos (NIKITIN, 1966). A preparação da pasta celulósica consiste na separação das fibras dos demais componentes constituintes do organismo vegetal, em particular a lignina uma vez que a quantidade desta na pasta interfere na coloração e em sua utilização posterior (CARPENTER et al., 1963; NAVARRO; NAVARRO; TAMBOURGI, 2007).

Na produção de celulose branqueada, pelo processo Kraft, são utilizados agentes químicos para separar a fibra através da dissolução dos componentes não celulósicos e não fibrosos. O rendimento do processo químico é menor que o do mecânico, pois os constituintes não celulósicos são parciais ou totalmente removidos, somente 40% a 50% da massa inicial total da madeira é aproveitada. As fibras obtidas por polpação química são mais longas e flexíveis que as obtidas por processos mecânicos. O principal processo químico é o Kraft (ou sulfato) (NOLETTO et al., 2010; NAVARRO; NAVARRO; TAMBOURGI, 2007).

No Brasil, o processo de polpação química mais utilizado é o processo Kraft, que significa forte em alemão, ou, como conhecido internacionalmente, processo sulfato. Neste processo químico os cavacos de madeira são submetidos à reação com uma solução contendo hidróxido de sódio (NaOH) e sulfeto de sódio (Na₂S): o licor branco. Isso ocorre dentro de um equipamento chamado digestor, onde é feito o cozimento da madeira, mantido a altas pressões e temperaturas. Esse processo químico visa a dissolver a lignina para separar as fibras. Assim é obtida uma pasta com rendimento ao redor de 50 %. Essa pasta é muito empregada para a produção de papéis cuja resistência seja o principal fator (NOLETTO et al., 2010; NAVARRO; NAVARRO; TAMBOURGI, 2007).

Depois da formação da polpa, esta passa por um processo de depuração no qual são removidos os cavacos de madeira que não foram cozidos na polpação química, por meio de peneiras de vários tipos e formatos. Os produtos

químicos usados, licor branco, no cozimento dos cavacos, reagem com a lignina e a fragmentam em substâncias de baixa massa molar que se solubilizam na solução alcalina, formando o licor negro, e podem ser removidas das fibras por várias etapas de lavagem (SANTOS et al., 2001). O licor negro, separado das fibras, segue para a caldeira de recuperação, onde é queimado, fornecendo vapor e recuperando os produtos químicos do cozimento.

A pasta celulósica resultante da polpação ainda não é adequada para a produção de determinados tipos de papel devido a sua coloração escura (marrom). Essa coloração é resultante, principalmente, de pequenas quantidades de lignina que não foram removidas das fibras, chamada agora de lignina residual (SANTOS et al., 2001). A fim de se obter polpas totalmente brancas, é necessário remover essa lignina residual, através do processo de branqueamento, que pode ser definido como um tratamento físico-químico cujo objetivo é melhorar as propriedades da pasta celulósica. Algumas propriedades relacionadas com este processo são: alvura, limpeza e pureza química. Como a lignina residual encontra-se fortemente ligada às fibras o branqueamento deve ser realizado em várias etapas, garantindo a obtenção de polpas de alvuras elevadas, com mínima degradação da celulose (SANTOS et al., 2001; ROBERT, 2007). Nas várias etapas do processo de branqueamento da celulose, podem ser utilizados reagentes químicos como cloro (Cl_2), dióxido de cloro (ClO_2), hipoclorito de sódio (NaClO), oxigênio (O_2) e ozônio (O_3), por exemplo. Entre uma etapa e outra, a polpa é lavada com grande quantidade de água, para a remoção das substâncias responsáveis pela coloração. Depois que a polpa celulósica atinge um nível adequado de alvura, passa-se para a etapa de formação da placa celulósica, produto final das fábricas de celulose. Para que isto ocorra, a polpa é continuamente depositada sobre uma tela onde ocorre a remoção de água, por meio de vácuo, pela parte de baixo. Em seguida a celulose é seca e enrolada em grandes bobinas. Como nem sempre as indústrias que produzem a celulose também fabricam o papel, a placa de celulose contínua é geralmente cortada em placas individuais e, então, enfardada para ser enviada às fábricas de papel (SANTOS et al., 2001).

A pasta mecânica de alto rendimento é produzida com rendimento superior a 80% na transformação da madeira em pasta celulósica. Esse tipo de

pasta de materiais ligno-celulósicos é obtido por processo puramente mecânico no qual as fibras são prensadas a úmido contra um rolo giratório cuja superfície é coberta por um material abrasivo, reduzindo-as a uma “pasta mecânica” (*groundwood*) (NAVARRO; NAVARRO; TAMBOURGI, 2007).

A pasta quimitemomecânica é uma pasta de alto rendimento. Esse tipo de pasta de materiais ligno-celulósicos, previamente e levemente tratados com reagentes químicos, é obtido por desfibramento em desfibrador a disco sob pressão (NAVARRO; NAVARRO; TAMBOURGI, 2007). A pasta quimitemomecânica é produzida apenas com fibra curta.

A matéria prima fibrosa secundária é aquela que é reutilizada após ter sido reciclada. Podem ser aparas pré-consumo e/ou aparas pós-consumo.

A apara pré-consumo é o papel cartão que foi reciclado, saindo das gráficas e retornando ao ciclo de fabricação do cartão. Trata-se de um material recebido de vários fornecedores, sendo bem diversificado, como embalagens de remédios, produtos alimentícios, etc. Em sua composição pode ter fibra longa e/ou curta, dependendo do tipo de cartão. Esse tipo de apara não passa pelas mãos do consumidor final podendo ser considerada, na verdade, sobra industrial. A apara pós-consumo é o papelão fabricado pelo processo Kraft utilizando fibras curtas e longas. Nos processos de coleta seletiva, as cooperativas selecionam as aparas e as encaminham para as fábricas que fazem reciclagem de papel.

A matéria prima fibrosa secundária pode ser obtida pelo uso direto das aparas ou então por processamento anterior de destintamento e depuração. Durante o processo de fabricação de papel, as fibras sofrem encurtamento e perda das paredes externas, devido aos produtos químicos e à ação mecânica dos equipamentos de produção, principalmente dos refinadores. Isso faz com que as fibras recicladas tenham baixas propriedades mecânicas, quanto mais reciclada maior é a perda mecânica da fibra.

Segundo a Resolução nº 71, de 12 de setembro de 2013 (CAMEX), o cartão semirrígido é um produto fabricado e seco continuamente, resultante da união, em estado úmido, de três ou mais camadas superpostas de papéis - forro,

miolo de uma ou mais camadas, e suporte - iguais ou distintas, que se aderem por compressão. É formado por celulose de fibras curtas e/ou longas, extraídas por processo químico e/ou mecânico, branqueadas e não-branqueadas.

Os cartões podem ser produzidos com duas ou três camadas (capa, miolo e suporte), que podem ser diferenciados em duplex e tríplex.

O cartão duplex é composto por dois tipos de polpa, um suporte não branqueado e o forro de polpa química branqueada. Apresenta boa superfície de impressão. Utilizado para produtos que necessitam de boa aparência externa e que, geralmente, vêm acondicionados numa embalagem primária, como pastas de dente, tubos de cola, farmacêuticos, etc (MOURAD, 1999). Já o cartão tríplex é composto por uma camada intermediária, o suporte e o forro. É usado quando uma melhor aparência interna é necessária, como, por exemplo, em uma embalagem que vai ser aberta várias vezes. Este tipo de cartão é usado para produtos alimentícios, perfumaria, cosméticos, higiênicos, etc. (MOURAD, 1999). A camada miolo pode ser composta de fibra virgem e/ou conter aparas pré e pós-consumo. A polpa reciclada é incorporada ao cartão para reduzir seu custo e normalmente é associada a uma camada de polpa branqueada, para melhorar a aparência e atuar como superfície de impressão adequada. A polpa Kraft (processo sulfato) é usada quando uma maior resistência mecânica é necessária (MOURAD, 1999).

Os cartões de fibra virgem são compostos por celulose branqueada e pasta de celulose de alto rendimento.

Na produção do cartão, as esteiras são abastecidas com os materiais requeridos (celulose, pasta e aparas) para a capa, miolo e suporte. Por conter muitos contaminantes as aparas passam por um sistema de depuração onde é feita a limpeza, destintamento e demais tratamentos necessários para torná-las apropriadas para serem misturadas com a pasta mecânica e, assim, formar a massa do miolo. A pasta mecânica é desagregada antes de ser misturada com as aparas. Para capa e suporte, a celulose é desagregada e depois refinada antes de ir para os tanques específicos. Em seguida cada massa é encaminhada para vai para sua respectiva caixa de entrada, capa, miolo e suporte da máquina de papel iniciando-se a formação do cartão. A produção de todos os tipos de

cartões é feita seguindo os mesmos procedimentos alterando apenas a composição das massas de cada camada e os ajustes em máquina.

4. AMOSTRAS

4.1. Amostras de Cartão da Análise Interlaboratorial

A fim de se verificar o desempenho do método (validação) foram adquiridas duas amostras (1 e 2) de cartão de concentração conhecida do “Escritório de Referência alemão para Testes de Proficiência e Materiais de Referência” (DRRR - Deutsches Referenzbüro für Ringversuche und Referenzmaterialien). Sendo a amostra 1, um papel cartão de fibra reciclada (RM CP B MOK 5) e a amostra 2, um papel cartão de fibra virgem com contaminação cruzada por fase gasosa (RM CP B PK MO K 1).

As concentrações conhecidas da amostra 1 são, em mg/kg: $276,1 \pm 24,9$ de $MOSH_{(C16-C25)}$; $199,1 \pm 26,8$ de $MOSH_{(C25-C35)}$; $70,5 \pm 10,2$ de $MOAH_{(C16-C25)}$ e $40,2 \pm 4,2$ de $MOAH_{(C25-C35)}$.

As concentrações conhecidas da amostra 2 são, em mg/kg: $24,1 \pm 3,3$ de $MOSH_{(C16-C25)}$; $5,6 \pm 1,2$ de $MOSH_{(C25-C35)}$; $18,6 \pm 3,4$ de $MOAH_{(C16-C25)}$ e $4,6 \pm 1,9$ de $MOAH_{(C25-C35)}$.

As amostras foram recebidas em 21/11/2018. A amostra 2 foi analisada de 11 a 15/02/2019. Já a amostra 1 foi analisada de 18 a 22/02/2019.

4.2. Amostras

As amostras foram fornecidas por uma empresa que produz cartões para contato com alimentos. As amostras de cartão analisadas foram produzidas com dois tipos de fibras, a fibra virgem e a secundária (aparas), que podem ser tanto de pinus quanto de eucalipto, dependendo de sua característica e fornecedor.

A matéria prima fibrosa virgem é aquela que foi utilizada pela primeira vez para a fabricação de papel, como a celulose branqueada e as pastas de alto rendimento (Pasta Mecânica e Pasta Quimitermomecânica).

As amostras de cartão foram coletadas assim que saíram da máquina. Foi utilizada luva para o procedimento e evitado qualquer contato que pudesse contaminar as amostras. O material utilizado para cortar as amostras foi

previamente limpo com álcool e as amostras foram então embaladas em folha de alumínio e depois em embalagem plástica. As amostras de aparas foram embaladas apenas em embalagem plástica. A Tabela 2 traz as principais informações sobre cada amostra analisada.

Tabela 2 - Principais informações sobre as amostras analisadas.

Amostra	Composição	Época
Cartão tipo 1 (1A)	51% de Aparas Pré-consumo e 49% de Fibra Virgem	1
Cartão tipo 1 (1B)	51% de Aparas Pré-consumo e 49% de Fibra Virgem (Pasta de Alto Rendimento)	2
Cartão tipo 1 (1C)	48% de Aparas Pré-consumo e 52% de Fibra Virgem	3
Cartão tipo 2 (2A)	29% de Aparas Pré/Pós-consumo e 71% de Fibra Virgem	1
Cartão tipo 2 (2B)	26% de Aparas Pré/Pós-consumo e 74% de Fibra Virgem	2
Cartão tipo 2 (2C)	26% de Aparas Pré/Pós-consumo e 74% de Fibra Virgem	3
Cartão tipo 3 (3A)	100% Fibra Virgem (pasta de celulose)	3
Cartão tipo 3 (3B)	100% de Fibra Virgem	3
AP 1	Aparas Pré-Consumo	3
AP 2	Aparas Pós-Consumo	3

*Cartão tipo 2 tem mais aparas pré-consumo do que pós-consumo.

5. MATERIAIS E MÉTODO

Os materiais e o método utilizados neste trabalho foram baseados no método criado pelo Laboratório Cantonal de Zurique e o Laboratório Nacional de Referência do Instituto Federal de Avaliação de Risco (BfR, 2012), o qual descreve a extração, pré-separação e determinação quantitativa de hidrocarbonetos de óleos minerais (MOSH – Hidrocarbonetos Saturados de Óleo Mineral e MOAH – Hidrocarbonetos Aromáticos de Óleo Mineral) ou plásticos (POSH – Hidrocarbonetos Saturados Oligoméricos Poliolefínicos e PAO – Poli Alfa Olefinas) em materiais de embalagem e alimentos secos. A extração dos hidrocarbonetos é seguida pela separação entre a fração contendo MOSH, POSH e PAO e a fração contendo MOAH por um cartucho de extração em fase sólida (SPE) de sílica gel ativada (400°C/4h) / nitrato de prata (0,3%).

A determinação quantitativa final de ambas as frações foi realizada por GC-FID com grande volume de injeção (LVI) (20 µL) na coluna por meio do

injetor MMI da Agilent em modo de vaporização com temperatura programada (PTV) *Solvent Vent*.

5.1. Materiais

5.1.1. Solventes e Vidrarias (BfR, 2012)

Acetona (P.A); Metanol (P.A); Hexano (P.A); Diclorometano (puro); n-Hexano; Tolueno (grau HPLC); Etanol (puro); Água Milli-Q; Sílica gel 60 (0,063 – 0,200 mm), Merck; Nitrato de prata (P.A), Merck; Filtro de fibra de vidro com 19,8 mm de diâmetro (Ref. 047017), Thermo Fisher®; Seringas de 20 mL, Fortuna Óptima®; Insertos de vidro de 300 µL para vials âmbar GC de 2 mL.

5.1.2. Padrões Analíticos

Na Tabela 3 estão apresentados os padrões analíticos necessários e na Figura 1 está a sequência de eluição dos componentes MOSH e MOAH.

Tabela 3 - Padrões analíticos (BfR, 2012):

Função Principal	Substância (inglês)	Substância (português)	Nº CAS	Abreviação	Fração
Protetor	n-Undecane	n-Undecano	1120-21-4	C11	MOSH, POSH, POA
Indicador	n-Tridecane	n-Tridecano	629-50-5	C13	
Quantificador	Bicyclohexyl	Biciclohexil	92-51-3	CyCy	
Marcador	5α - Cholestane	5α - Colestano	481-21-0	Cho	
Marcador	1,3,5-Tri-tert-butylbenzene	1,3,5-Tri-terc-butilbenzeno	1460-02-2	TBB	MOAH
Quantificador	1-Methylnaphthalene	1-Metilnaftaleno	90-12-0	1 MN	
Quantificador	2-Methylnaphthalene	2-Metilnaftaleno	91-57-6	2 MN	
Protetor	Pentylbenzene	Pentilbenzeno	538-68-1	5 B	
Marcador	Perylene	Perileno	198-55-0	PER	

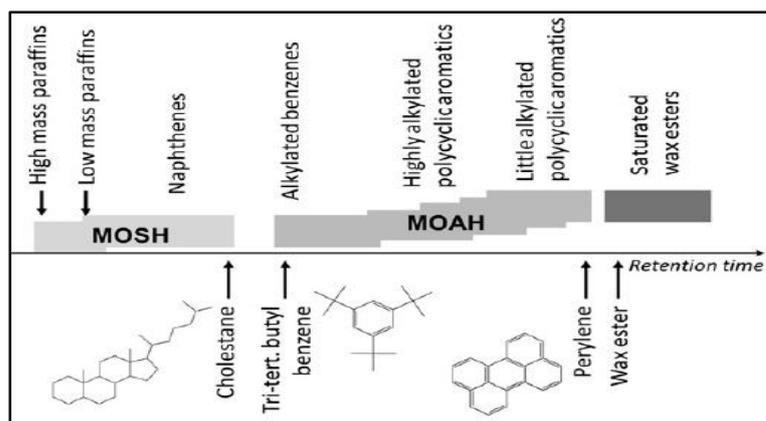


Figura 1 – Sequência de eluição, da SPE, de componentes MOSH e MOAH (parte superior) e os padrões utilizados para estabelecer e verificar as janelas de fração (parte inferior) (BIEDERMANN & GROB, 2012a).

Conforme ilustrado esquematicamente na Figura 1, na etapa de pré-separação (SPE) as parafinas de massa molecular elevada são os primeiros componentes da fração MOSH a serem eluídos. As parafinas de massa molecular mais baixa são eluídas um pouco mais tarde devido ao efeito de exclusão de tamanho. Os naftenos, parcialmente separados das parafinas, e seus constituintes policíclicos são os últimos a serem eluídos na fração MOSH.

Na fração MOAH o primeiro tipo de componente a ser eluído tem um único anel aromático e a estrutura aromática é protegida estericamente por elevada alquilação. Os MOAH com mais anéis e menos alquilações são eluídos por último. Seguindo de perto os MOAH estão os ésteres de cera compostos por ácidos graxos de cadeia longa esterificados com álcoois graxos de cadeia longa, com as espécies saturadas sendo eluídas primeiro.

Os padrões analíticos são importantes tanto para o desenvolvimento do método como para a verificação de seu desempenho na análise de rotina, pois eles marcam as extremidades das frações de MOSH e MOAH. O 5- α -Colestano (Cho, quatro anéis saturados, ver Figura 1) serve para estabelecer o fim da fração de MOSH e deve estar totalmente presente na fração de MOSH e ausente na de MOAH. O Tri-terc-butilbenzeno (TBB) é utilizado como marcador para o início da fração de MOAH e deve estar totalmente presente na fração de MOAH. O fim da fração MOAH é definido pelo Perileno (PER), um hidrocarboneto não

alquilado com 5 anéis aromáticos. O PER deve ser separado dos ésteres de cera saturados.

Dos demais padrões internos (P.I), os que são usados para auxiliar na quantificação das frações MOSH e MOAH por cromatografia gasosa, são: Biciclohexil (CyCy), para a fração MOSH; e 1-Metilnaftaleno, 1MN, (ou 2-Metilnaftaleno, 2MN), para a fração MOAH.

Por fim os padrões internos n-Undecano (C11) e n-Tridecano (C13) são usados, na fração MOSH, como protetor contra perda, por volatilidade, e indicador do CyCy, respectivamente. Já o Pentilbenzeno (5B), na fração MOAH, é usado como protetor contra perda, por volatilidade, do 1MN e do 2MN.

5.1.3. Equipamento

As frações do óleo mineral foram analisadas em cromatógrafo a gás Agilent, modelo 7890A (G3440-A) acoplado a um detector de ionização de chama e operando com coluna HP-1, 100% dimetilpolissiloxano de 30 m x 320 µm x 0,25 µm, marca Agilent (19091 J-413). O injetor utilizado foi um MMI - Agilent Multimode Inlet (G3510B). As condições de operação estão descritas no procedimento do método.

5.2. Controle para minimização de contaminação

Todo o fluxo de trabalho foi controlado a fim de se evitar possíveis contaminações. Os brancos foram usados ao longo da rotina diária, a fim de evitar a contaminação durante a manipulação da amostra. Na análise de hidrocarbonetos, a utilização de loção para mãos (por pessoal de laboratório), graxa de juntas de vidro esmerilhado, evaporadores rotativos e seringas foram identificadas como as maiores fontes de contaminação.

Várias vidrarias (por exemplo, vials para GC ou pipetas Pasteur) são normalmente embaladas em embalagens de cartão ou em poliolefinas (plástico). Assim, as vidrarias de laboratório embaladas nestes materiais foram lavadas com solventes e esterilizadas antes de sua utilização.

A fim de evitar contaminações subsequentes de hidrocarbonetos, as vidrarias de laboratório, previamente lavadas e esterilizadas, foram mantidas

protegidas (por exemplo, armazenadas em assadeiras de alumínio cobertas com folha de alumínio) até à sua utilização.

5.3. Procedimentos do Método

5.3.1. Preparo de Soluções Estoque, Mix de Padrão Interno (P.I) e Sílica gel / 1% Ag

Preparo de Soluções Estoque (A-F)

Os padrões internos (P.I) líquidos foram recolhidos dos frascos originais com pipetas Pasteur de vidro, esterilizadas, e transferidos para vials âmbar de 2 mL com tampas com septo de PTFE e os volumes requeridos de cada um foram pipetados com as respectivas seringas (de 50 μ L e 250 μ L) e os padrões foram pesados nos respectivos balões de cada solução estoque. Os P.I sólidos foram pesados usando-se béqueres de 10 mL e espátulas com colherzinha para miligramas na ponta e foram dissolvidos, antes de serem transferidos para os respectivos balões das soluções estoque, com pequena quantidade de tolueno HPLC.

- ✓ **Solução Estoque A (6 g/L de C11 e 3 g/L de C13):** Em um balão volumétrico de 20 mL foram pesados 120 mg (~162 μ L) de n-Undecano (C11) e 60 mg (~79 μ L) de n-Tridecano (C13). O volume do balão foi completado com tolueno grau HPLC até o menisco. A solução estoque A, foi transferida para um frasco de vidro âmbar de 24 mL que foi lacrado com lacre de alumínio com septo de PTFE.
- ✓ **Solução Estoque B (12 g/L de Cho):** Em um balão volumétrico de 10 mL foram pesados 120 mg de 5- α -Colestano (Cho). O volume do balão foi completado com tolueno HPLC até o menisco. A solução estoque B, foi transferida para um frasco de vidro de 10 mL coberto com folha de alumínio, que foi lacrado com lacre de alumínio com septo de PTFE.
- ✓ **Solução Estoque C (6 g/L de CyCy):** Em um balão volumétrico de 20 mL foram pesados 120 mg (~139 μ L) de Biciclohexil (CyCy). O volume do balão foi completado com tolueno HPLC até o menisco. A solução estoque

C, foi transferida para um frasco de vidro âmbar de 24 mL que foi lacrado com lacre de alumínio com septo de PTFE.

- ✓ **Solução Estoque D (6 g/L de 5B, 1MN e 2MN):** Em um balão volumétrico de 20 mL foram pesados 120 mg (~ 139 µL) de Pentilbenzeno (5B), 120 mg (~120 µL) de 1-Metilnaftaleno (1MN) e 120 mg de 2-Metilnaftaleno (2MN). O volume do balão foi completado com tolueno HPLC até o menisco. A solução estoque D, foi transferida para um frasco de vidro âmbar de 24 mL que foi lacrado com lacre de alumínio com septo de PTFE.

- ✓ **Solução Estoque E (6 g/L de TBB):** Em um balão volumétrico de 20 mL foram pesados 120 mg de 1,3,5-Tri-terc-butilbenzeno (TBB). O volume do balão foi completado com tolueno HPLC até o menisco. A solução estoque E, foi transferida para um frasco de vidro âmbar de 24 mL que foi lacrado com lacre de alumínio com septo de PTFE.

- ✓ **Solução Estoque F (1,2 g/L de PER):** Em um balão volumétrico de 20 mL foram pesados 24 mg de Perileno (PER). O volume do balão foi completado com tolueno HPLC até o menisco. A solução estoque F, foi transferida para um frasco de vidro âmbar de 24 mL que foi lacrado com lacre de alumínio com septo de PTFE.

Preparo do Mix de P.I

Para um balão volumétrico de 10 mL, foram transferidos 5 mL de solução estoque F e 0,5 mL das soluções estoque A-E. O volume do balão foi completado com tolueno HPLC até o menisco. A solução resultante (Mix de P.I) foi transferida para um frasco de vidro de 10 mL coberto com folha de alumínio, que foi lacrado com lacre de alumínio com septo de PTFE. Assim, a concentração dos padrões no Mix é 0,3 g/L para C11, CyCy, 1MN, 2MN e TBB; 0,15 g/L para C13; 0,6 g/L para Cho e PER.

De acordo com o método BfR (2012), com armazenamento refrigerado e com exclusão de luz, a solução assim preparada é estável por 6 meses.

Portando, as soluções estoque e o Mix de P.I foram armazenadas em geladeira (com temperatura controlada, ~ 5 °C).

Preparo da sílica gel / 1% AgNO₃

Em balão de fundo chato de 250 mL, envolto em folha de alumínio, foram pesados 49,5 g de sílica gel. Em um béquer de 100 mL, envolto em folha de alumínio, foram pesados 0,5 g de nitrato de prata, que foi dissolvido com 50 mL de água milli-Q. A solução de nitrato de prata foi então transferida para o balão de fundo chato de 250 mL, para ocorrer uma reação entre o nitrato de prata e a sílica gel. Para que a água fosse evaporada, o balão de fundo chato de 250 mL foi colocado em estufa a 70°C durante 1 hora; a 80°C durante 1 hora e a 90°C "over night".

Após ser retirado da estufa, no dia posterior, o balão foi fechado com folha de alumínio e armazenado em dessecador para esfriar. Depois a sílica gel / 1% AgNO₃ foi transferida para um frasco schott de vidro âmbar de 500 mL, envolto em folha de alumínio, e armazenado em dessecador, protegido da luz. Segundo o método BfR (2012), esta sílica tem validade de 1 ano se armazenada em local seco e escuro.

5.3.2. Etapas do Procedimento Experimental

Descontaminação de Vidrarias

As vidrarias limpas foram lavadas também com os solventes de descontaminação: acetona, metanol e hexano; e foram esterilizadas em estufa a aproximadamente 50°C de 30 a 60 minutos. As vidrarias utilizadas foram separadas em assadeiras de alumínio cobertas com folha de alumínio. Foi encaixado um filtro de fibra de vidro na extremidade inferior das seringas de SPE e outro filtro de fibra de vidro apoiado na extremidade superior, quando as mesmas foram esterilizadas.

Preparo da sílica gel ativada (400 °C/4h) / 0,3% AgNO₃

Em duas cápsulas de platina foram pesados 4,52 g de sílica gel para ser realizada sua ativação a 400°C durante 4 horas em uma mufla. Em um frasco schott de 100 mL envolto com folha de alumínio foram pesados 4,52 g de sílica

gel / 1% de AgNO₃, e o frasco foi armazenado no dessecador protegido da luz. Depois de ativada, a sílica gel foi transferida para o frasco schott de 100 mL e foi feita a homogeneização dos dois tipos de sílica (a ativada e a com 1% de Ag). O frasco schott de 100 mL foi novamente armazenado no dessecador protegido da luz, até a preparação das colunas de SPE.

Preparação da Amostra - Corte e Homogeneização

Em uma assadeira de alumínio forrada com folha de alumínio, a amostra foi cortada em pedaços de não mais que 2 cm de comprimento. Em seguida pesou-se, em balança analítica, uma triplicata de 2,0 g ($\pm 0,1$ g) da amostra em tubos de centrífuga de 50 mL.

Preparo das colunas de SPE

As colunas de SPE foram preparadas em seringas de 20 mL com filtro de fibra de vidro de 19,8 mm de diâmetro, colocado com auxílio de uma pinça de metal, previamente esterilizada.

Em balança analítica, foram pesados 3 g de sílica gel ativada / 0,3% AgNO₃, em cada uma das 4 seringas de 20 mL, conforme descrito pelo método BfR (2012) (pág. 8, item 4.2), o nível da sílica foi acertado e, a seguir, foi colocado outro filtro de fibra de vidro, com auxílio de uma pinça de metal, em cima da sílica formando um sanduíche. As seringas foram envoltas em folha de alumínio e a parte superior delas também foi coberta com folha de alumínio. Foram armazenadas em dessecador protegido da luz, até seu uso.

Preparo da Amostra

a) Preparo da solução de n-hexano/etanol 1:1 (v/v):

Em um erlenmeyer de 125 mL foram misturados 30 mL de n-hexano e 30 mL etanol. Em seguida a boca do Erlenmeyer foi coberta com folha de alumínio e a solução foi agitada manualmente para homogeneização.

b) Extração dos Hidrocarbonetos de Óleo Mineral (MOH) da amostra:

Em cada um dos 4 tubos de centrífuga (1 para o branco e 3 para a triplicata da amostra) foram adicionados 10 mL da solução de etanol / n-hexano (1:1; v/v).

Os tubos foram fechados e vigorosamente agitados em um vórtex (na rotação máxima do equipamento) durante 1 minuto e 30 segundos, e então foram deixados em repouso à temperatura ambiente durante 2 horas. Antes de recolher o extrato da amostra, os tubos foram agitados, manualmente, novamente.

c) Obtenção do extrato da amostra:

A fim de remover o etanol, 4 mL do extrato, de cada tubo, foram pipetados com pipeta volumétrica de 4 mL e transferidos para outros 4 tubos de centrífuga de 50 mL. Em seguida foram adicionados, em cada um dos tubos com 4 mL de extrato, 20 µL do Mix de P.I com o auxílio de uma seringa de 50 µL. Os tubos foram agitados com o vórtex por 30 segundos, a fim de homogeneizar a mistura.

Depois foram adicionados, em cada tubo, 10 mL de água milli-Q, com pipeta graduada de 10 mL. Nessa etapa ocorreu a separação de fases e o sobrenadante (fase de n-hexano) foi recolhido com pipeta Pasteur de vidro e transferido para vial âmbar de 2 mL com tampa com septo de PTFE, de modo que no final desta etapa têm-se 4 vials: 1 com o extrato do branco e outros 3 com o extrato da triplicata da amostra.

Preparo do Eluente B (EB)

O eluente B foi preparado em balão volumétrico de 100 mL onde foram adicionados 75 mL de n-hexano, 5 mL de tolueno HPLC e 20 mL de diclorometano. A solução do balão foi homogeneizada e deixada na capela até a hora de ser usada na SPE.

Observação: esta solução deve ser fresca, ou seja, deve ser preparada no dia que for usada.

Procedimento de Extração em Fase Sólida (SPE)

As frações foram recolhidas em frascos de vidro âmbar de 24 mL, cujas bocas foram cobertas com folha de alumínio e posteriormente lacradas com lacre de alumínio com septo de PTFE e deixados no escuro até a hora de evaporar o solvente no rota-evaporador. Foram adicionados 300 µL (0,3 mL) de tolueno HPLC nas frações MOSH, a fim de protegê-las contra a perda de padrões e componentes mais voláteis da amostra, antes dos frascos serem lacrados.

Antes de começar a SPE foram pipetados os volumes necessários de Eluente A (n-hexano) com pipeta graduada de 10 mL, sendo: 10 mL transferidos para um frasco de vidro de 24 mL (EA 1); 2 mL transferidos para um béquer de 5 mL (EA 3); 4 mL transferidos para um béquer de 10 mL (EA 4). Também foram pipetados os volumes necessários de Eluente B com pipetas volumétricas de 2 mL e 6 mL, sendo: 2 mL transferidos para um béquer de 5 mL (EB 5); 12 mL transferidos para um frasco de vidro de 24 mL (EB 6). Todos os frascos e béqueres foram cobertos com folha de alumínio até serem usados na SPE.

As luzes do laboratório e da capela foram apagadas até a conclusão da etapa de condicionamento da coluna de SPE com 10 mL de eluente A (EA 1, n-hexano), devido à prata (Ag) presente na sílica gel.

No primeiro passo foi feito o condicionamento da coluna com 10 mL de eluente A (EA 1). Os 10 mL foram descartados em béquer de descarte de 100 mL. No segundo passo (ainda com o béquer de descarte), sem que a coluna secasse, foram pipetados 200 μ L (0,2 mL) do extrato do branco usando-se uma seringa de vidro de 250 μ L e adicionados na coluna de SPE ("EA" 2). No terceiro passo (ainda com o béquer de descarte) foi feita a eluição do volume morto com 2 mL de eluente A, adicionados na coluna de SPE, antes que ela secasse (EA 3).

No quarto passo, antes da coluna secar, trocou-se o béquer de descarte por um frasco de vidro âmbar de 24 mL e foi iniciada a eluição da fração MOSH com 4 mL de eluente A (EA 4). No quinto passo (ainda com o frasco MOSH), antes de a coluna secar, foram adicionados 2 mL de eluente B para finalizar a coleta da fração MOSH (EB 5). Antes de a coluna secar, trocou-se o frasco da fração MOSH pelo da fração MOAH.

Antes de lacrar o frasco da fração MOSH, foram adicionados 0,3 mL (300 μ L) de tolueno HPLC, com pipeta graduada de 1 mL, em seguida a boca do frasco foi coberta com folha de alumínio e lacrada com lacre de alumínio com septo de PTFE.

No sexto passo, adicionou-se 12 mL de eluente B e recolheu-se a fração MOAH até a coluna secar (EB 6). Em seguida a boca do frasco foi coberta com folha de alumínio e lacrada com lacre de alumínio com septo de PTFE.

Repetiu-se o procedimento descrito acima para os extratos das triplicatas da amostra. Cada extrato foi adicionado em uma coluna de SPE própria. *Vide* esquema da SPE (BfR, 2012) no Anexo 1.

Procedimento de evaporação de solvente

A fim de se enriquecer as frações MOSH e MOAH foi feita a evaporação de solventes utilizando-se um rota-evaporador com temperatura de banho em torno de 57°C, rotação em torno de 55 rpm e pressão da bomba de vácuo em torno de - 500 mmHg.

Primeiro foi feita a limpeza do evaporador rotativo evaporando-se cerca de 40 mL de n-hexano em balão de fundo chato de roto-evaporação de 250 mL. A fim de fazer a roto-evaporação das frações MOSH e MOAH, do branco e da triplicata da amostra, estas foram transferidas para balões de fundo chato de roto-evaporação de 125 mL.

As frações MOSH foram roto-evaporadas até se obter 250-300 µL de solução que foi recolhida com pipeta Pasteur de vidro, e transferida para um vial âmbar (GC) de 2 mL com inserto de vidro de 300 µL e tampa com septo de PTFE. Ao final foi feita novamente a limpeza do evaporador rotativo evaporando-se cerca de 40 mL de n-Hexano no balão de fundo chato de 250 mL.

Após a concentração, as amostras foram então analisadas por GC-FID com injetor MMI.

GC-FID com injetor MMI (PTV) (Agilent, 2009)

O desejo de aumentar o volume de injeção tem, normalmente, o objetivo de melhorar a análise de traços. Pois, ao introduzir mais da amostra no sistema, a massa de analito que chega ao detector será proporcionalmente aumentada, resultando em maiores áreas e alturas de pico. Se o ruído da linha de base for mantido constante, maiores alturas de pico significam maiores relação sinal/ruído e menores limites de detecção do sistema.

O *Large Volume Injection* (LVI) pode ser aplicado em volumes de injeção que variam de alguns microlitros até 1 mL ou mais. Na maioria das abordagens por LVI, o solvente da amostra é seletivamente evaporado e removido do sistema de entrada antes dos analitos serem transferidos para a coluna de separação. Desta forma, o LVI é semelhante à evaporação com nitrogênio ou evaporação rotativa de solvente, com o benefício adicional de ser realizado na entrada do GC em vez de ser realizado em capela. Os analitos que seriam perdidos durante a evaporação com nitrogênio podem ser retidos na entrada e analisados com sucesso via LVI. Além disso, o processo de LVI pode ser automatizado e reproduzível. Como nas outras técnicas de evaporação, a abordagem por LVI é uma função do tipo de solvente, da temperatura de entrada, do fluxo de ventilação do gás de evaporação e do ponto de ebulição do analito. Além disso, a pressão de entrada durante a evaporação e o liner de entrada tem um impacto na taxa de remoção de solvente e na recuperação do analito.

Injetor de Injeção de Grande Volume (LVI) da Agilent: Multimode Inlet (MMI) – “PTV Solvent Vent” (para injeções de 5 – 1000 µL): O modo de ventilação de solvente é o método que permite ao MMI efetuar LVI de mais de 5 µL. No modo de ventilação de solvente, a entrada é mantida a uma temperatura inicial baixa durante a aplicação da amostra. Pneumaticamente, a entrada está no modo split com uma baixa pressão de entrada. O fluxo de gás através do liner de entrada e saída para ventilação remove o solvente de evaporação. A amostra é injetada de modo que o líquido que entra é depositado na parede de revestimento e o solvente evapora a uma taxa similar. Uma vez que toda a amostra tenha sido injetada, a entrada muda para um modo splitless para a transferência do analito. A entrada é então aquecida para vaporizar a amostra concentrada e qualquer solvente remanescente e eles são transferidos para a coluna. Após um período suficiente para garantir a transferência da amostra, a entrada é então alterada para um modo de purga a fim de permitir que qualquer material remanescente no liner de entrada seja removido para o descarte. Durante a injeção da amostra e o período de ventilação de solvente, o forno do GC é mantido a uma temperatura apropriada para permitir que o solvente volte a focalizar os analitos na coluna. Quando isto estiver concluído, o forno é então programado para realizar a separação.

Uma Calculadora de Eliminação de Solventes integrada (*Solvent Elimination Calculator*) fornece um conjunto completo de condições iniciais para facilitar o desenvolvimento do método de injeção LVI com injetor MMI em modo PTV *Solvent Vent*. É preciso apenas informar o solvente utilizado (tolueno), o volume de injeção (20 µL) e o ponto de ebulição do primeiro analito (200°C) e o software calcula os demais parâmetros necessários.

- **Injetor MMI da Agilent em modo PTV Solvent Vent:**

Solvent: Toluene

Injection Volume (µL): 20

Boiling Point of first eluting analyte (°C): 200 °C.

Elimination Rate (µL/min): 97.04

Suggested Injection Rate (µL/min): 48.52

Inlet temperature: 75°C

Septum Purge Flow: 3 mL/min

Initial hold time: 0.41 min

First ramp rate: 600 °C/min

First temperature: 325°C

First hold time: 5 min

Vent time (sugerido): 0.41 min

Vent pressure (gauge): 5.000 psi

Outlet Pressure (gauge): 0.000 psi

Vent flow rate: 100 mL/min

Purge time: 2.91 min

Purge flow rate: 60 mL/min

Injection volume: 20 µL

Injection rate: 49 µL/min

Total Estimated Injection Time: 0.026148 min

Post Run: 250°C

Post Run Total Flow: 25 mL/min

- Coluna HP-1, 100% dimetilpolissiloxano de (30 m x 320 µm x 0,25 µm), Agilent 19091 J-413
Total Flow: 20 mL/min
Pressure: 10.5 psi
 - **Parâmetros do forno (oven):**
Oven temp on: 50°C
Equilibration Time: 0.25 min
Maximum Oven Temperature: 325°C
Post Run: 50°C
Post Run Time: 0 min
- A Tabela 4 apresenta a programação de temperatura da coluna.

Tabela 4 – Programação de temperatura da coluna.

	Taxa (°C/min)	Valor (°C)	Tempo (min)	Tempo da corrida (min)
Início	-	50	2.91	2.91
Rampa 1	5	140	0	20.91
Rampa 2	20	300	9.09	38

- **Parâmetros do detector FID:**
 - ✓ Temperatura do detector: 300°C
 - ✓ Fluxo de H₂: 30 mL/min
 - ✓ Fluxo de O₂: 60 mL/min
 - ✓ Fluxo de Makeup: 45 mL/min (He)
 - ✓ Fluxo coluna + makeup: 46 mL/min

Cálculo da concentração de MOSH e MOAH

No Mix de P.I temos os padrões internos quantificadores: fração MOSH, CyCy (0,3 g/L) e fração MOAH, 1MN (ou 2MN) (0,3 g/L). Usamos 20,0 µL de Mix de P.I e 2,00 g de amostra. Portanto, temos 6 µg de P.I quantificador com 2,00

g de amostra o que equivale a uma concentração de 3 ppm (ou mg/kg) de CyCy na fração MOSH e de 1MN (2MN) na fração MOAH.

Assim, é possível calcular a concentração de MOSH e MOAH na amostra por meio da fórmula a seguir (BfR,2012):

$$\text{Conc. Paper}_{\text{MOSH or MOAH}} (\text{ppm}) = \frac{(\text{Area}_{\text{MOSH or MOAH}} \cdot 3\text{ppm})}{\text{Area}_{\text{Internal-Standard}}}$$

Onde a concentração, em ppm (ou mg/kg), de MOSH ou MOAH é dada multiplicando a Área da fração MOSH (ou MOAH), em dado intervalo de nº de carbonos, pela concentração do padrão quantificador, CyCy (ou 1MN, ou 2MN), que é 3 ppm, e dividindo este resultado pela área do padrão quantificador da fração MOSH ou MOAH.

Os intervalos (I_1 e I_2) de integração para MOSH e MOAH foram obtidos, de acordo com o descrito pelo método BfR (2012) (pág.13, item 6):

$$C16 \leq I_1 < C25 \text{ (24 min a 29 min);}$$

$$C25 < I_2 < C35 \text{ (29 min a 35,5 min).}$$

Utilizando o recurso do software de integração do GC foi realizada a correção do branco nos cromatogramas obtidos para as frações MOSH e MOAH das triplicatas da amostra.

Das áreas totais corrigidas dos intervalos acima descritos, da fração MOSH foram subtraídos (quando presentes/ visíveis no cromatograma) os picos “sharp” dos hidrocarbonetos de número ímpar de carbonos de C23 a C35 que estão naturalmente presentes nos alimentos, não sendo considerados parte dos MOSH. Também foi subtraído da área do intervalo de C25 a C35 a área do padrão interno 5- α -colestano, Cho, que é o marcador final da fração MOSH e geralmente sai coeluído com o n-alcano C28 (ou C29, naturalmente presente nos alimentos).

Das áreas totais corrigidas dos intervalos acima descritos, da fração MOAH foram subtraídos os picos do diisopropilnaftaleno (DIPN) (do intervalo de

C16 a C25), quando presente na fração, e do padrão interno perileno, PER, (do intervalo C25 a C35) que é o marcador final da fração MOAH.

Para cada amostra foi feito um branco (MOSH e MOAH). Foram feitas três injeções do branco MOSH e do MOAH no GC-FID.

Como não existe material de referência certificado, não é possível fazer uma validação do método pela forma tradicional. Assim, a fim de se verificar a performance do método e validá-lo, fez-se uso de uma análise inter laboratorial com duas amostras de concentração conhecida de MOSH e MOAH nos intervalos de C16-C25 e C25-C35. Para cada uma dessas amostras foi obtido um branco MOSH e um MOAH e fez-se 2 injeções de cada a fim de se obter os limites de quantificação (LQ) e detecção (LD) de cada intervalo de cada fração.

Os limites de quantificação e detecção foram calculados usando as equações 11 e 12, respectivamente, do INMETRO (DOQ-CGCRE-008; Revi. 07., 2018):

$$\text{Limite de Quantificação (LQ)} = 0 + 10 \times S$$

$$\text{Limite de Detecção (LD)} = \text{LQ} / 3,3$$

S = Desvio-padrão (do branco, duas injeções).

Para cada amostra foi também calculado o intervalo de confiança. O branco foi injetado em triplicata e as frações MOSH e MOAH, analisadas em triplicata para cada amostra foram injetadas duas vezes no GC-FID. O intervalo de confiança (IC) (95%) é calculado usando a fórmula a seguir (Skoog, 2011):

$$IC (95\%) = \pm \frac{t_{(N-1;1-\alpha)} \times S}{\sqrt{N}}$$

Onde,

N é o nº de replicatas: N = 3 (branco) e 6 ou 4 (amostra);

1- α é o nível de probabilidade: $\alpha = 0,05$, para 1- $\alpha = 0,95$ (95%);

t é um teste estatístico conhecido como teste t de Student. Os valores de t de acordo com o nº de graus de liberdade e os níveis de probabilidade são obtidos da tabela 7-3 do Skoog, 2011:

$t_{(N-1; 1-\alpha)} = t_{(1; 0,95)} = 12,70$ (95%) (branco), para $N = 2$;

$t_{(2; 0,95)} = 4,30$ (95%) (branco ou amostra), para $N = 3$;

$t_{(3; 0,95)} = 3,18$ (95%) (amostra), para $N = 4$;

$t_{(5; 0,95)} = 2,57$ (95%) (amostra), para $N = 6$;

$t_{(\infty; 0,95)} = 1,97$ (95,5%) (amostras, análise interlaboratorial - DRRR), para um n° muito grande de graus de liberdade.

Para estabelecer os tempos de retenção dos padrões dos n-alcenos C16 (n-Hexadecano), C25 (n-Pentacosano) e C35 (n-Pentatriacontano), para o correto estabelecimento das faixas de carbonos para quantificação do MOSH e MOAH, soluções desses hidrocarbonetos foram adquiridas e analisadas durante o desenvolvimento do método apresentado.

5.4. Análise Estatística

Foi feito o DoE (planejamento experimental) linear generalizado com os fatores época com os níveis 1, 2 e 3, cartão com os níveis 1 e 2 e a fração com os níveis S1, S2, A1, A2 para a condução da análise. Foi feita a análise do planejamento experimental que resultou que os fatores época, cartão, fração e as interações época*cartão, cartão*fração são significativas ao nível de 95% de confiança. Depois foi feito os testes de variância de Bartlett e Levene que resultou em homocedasticidade ao nível de 95% e foi feito o teste de Tukey para verificar as diferenças significativas entre os conjuntos de dados conforme abaixo com nível de confiança de 95%.

Foi utilizado o software Addinsoft – XLSTAT – Version 2015.6.01.24494 e o Minitab versão 16.1.0.

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1. Análise Interlaboratorial (DRRR)

O z'-score foi o parâmetro escolhido para avaliar o desempenho de cada laboratório na determinação de MOSH e MOAH em cada intervalo considerado. Esse parâmetro permite que comparemos um valor específico com a população levando-se em conta o valor típico e a dispersão. Ele mostra o quanto uma medida se afasta da média em termos de desvios padrão. Quando o z-score é

positivo, significa que o dado está acima da média, quando ele é negativo, significa que o dado está abaixo da média.

Fórmula usada para o cálculo do z'-score:

$$z' - score = \frac{m - m_{best}}{\sqrt{s_{best}^2 + s_M^2}}$$

Onde:

m é o valor da concentração média (ou da mediana), obtida pelo laboratório, das replicatas da amostra (considerando os resultados obtidos por todos os laboratórios participantes, excluindo-se os outliers);

m_{best} é a melhor estimativa para o valor verdadeiro de concentração de MOSH ou MOAH na amostra (considerando os resultados obtidos por todos os laboratórios participantes, excluindo-se os outliers);

s_{best} é o desvio padrão (considerando os resultados obtidos por todos os laboratórios participantes, excluindo-se os outliers);

s_M é o desvio padrão da homogeneidade do material (valor fornecido pelo DRRR no relatório de resultados da análise).

A interpretação do esquema de avaliação sobre o desempenho dos laboratórios é a seguinte:

$ z' \leq 2,00$	Performance Satisfatória
$2,00 < z' < 3,00$	Performance Questionável
$ z' \geq 3,00$	Performance Não Satisfatória

6.1.1. Limites de Detecção e Quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram determinados com base nos resultados dos brancos obtidos na análise das amostras 1 e 2 do ensaio interlaboratorial. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) dos brancos da Amostra 1 e da Amostra 2 do ensaio interlaboratorial.

MOSH	LD	LQ
Nº de Carbonos (intervalo)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)
C16 a C25	0,6	1,9
C25 a C35	1,4	4,6
MOAH	LD	LQ
Nº de Carbonos (intervalo)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)
C16 a C25	1,7	5,5
C25 a C35	1,7	5,7

Quatro replicatas (N = 4).

Os limites de quantificação obtidos atendem limites máximos de óleo mineral em embalagens de alimentos feitas de papel, cartão ou papelão de fibras recicladas estabelecidos pelo Ministério Alemão de Nutrição, Agricultura e Proteção ao Consumidor (BMELV) publicado em julho de 2014. São eles: para MOSH (24 mg/kg) e para MOAH (6 mg/kg) na faixa C16–C25 para contato com alimentos secos e não oleosos ou C16–C35 para contato com alimentos úmidos.

6.1.2. Amostra 1

A amostra 1 é um cartão de fibra reciclada (RM CP B MOK 5). Foi obtido um branco MOSH e um do MOAH (cada um, injetado duas vezes no GC) e uma duplicata MOSH e MOAH da amostra (cada uma, injetada duas vezes no GC).

Os resultados da duplicata (A1 e A2) da amostra 1 (média de duas injeções, cada) são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Resultados da duplicata da Amostra 1 MOSH e MOAH.

MOSH	Replicata A1	Replicata A2	Média	S	N	t (95%)	IC (95%)
Nº de Carbonos (intervalo)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)			Conc. (mg/kg)
C16 a C25	227,9	206,1	217,0	15,4	4	3,18	24,5
C25 a C35	105,7	94,8	100,3	7,7	4	3,18	12,2

MOAH	Replicata A1	Replicata A2	Média	S	N	t (95%)	IC (95%)
Nº de Carbonos (intervalo)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)			Conc. (mg/kg)
C16 a C25	109,9	108,8	109,3	0,8	4	3,18	1,2
C25 a C35	12,8	11,1	12,0	1,1	4	3,18	1,8

S: desvio-padrão; N: nº de replicatas; $t_{(N-1, 1-\alpha)}$: t de Student; IC: Intervalo de confiança.

A seguir estão apresentados, na Tabela 7, os dados necessários para o cálculo do z'-score de cada intervalo (C16 a C25 e C25 a C35) de concentração das frações MOSH e MOAH na amostra 1. Os dados completos do ensaio interlaboratorial estão apresentados no anexo 2 (tabelas I - IV).

Tabela 7 – Dados utilizados no cálculo do z-score (Amostra 1)

		m_{best}	$\pm IC (95,5\%)$	S_{best}	S_M
Intervalo MOSH Amostra 1	C16 a C25	276,1	24,9	64,2	8,5
	C25 a C35	199,1	26,8	69,3	8,8

		m_{best}	$\pm IC (95,5\%)$	S_{best}	S_M
Intervalo MOAH Amostra 1	C16 a C25	70,5	10,2	26,2	1,2
	C25 a C35	40,2	4,2	9,3	2,0

A Tabela 8 a seguir mostra a performance do método para a amostra 1.

Tabela 8 – Performance do método para a Amostra 1 do ensaio interlaboratorial.

Faixa (nº de carbonos)	A1 (mg/kg)	A2 (mg/kg)	Média (mg/kg)	Z'-score	Performance
MOSH (C16-C25)	227,9	206,1	217,0	-0,91	Satisfatória
MOSH (C25-C35)	105,7	94,8	100,3	-1,41	Satisfatória
MOAH (C16-C25)	109,9	108,8	109,3	1,53	Satisfatória
MOAH (C25-C35)	12,8	11,1	12,0	-2,97	Questionável

6.1.3. Amostra 2

A amostra 2 é um cartão de fibra virgem com contaminação cruzada por fase gasosa (RM CP B PK MO K 1). Foi obtido um branco MOSH e um MOAH (cada um, injetado duas vezes no GC) e uma duplicata MOSH e MOAH da amostra (cada uma, injetada duas vezes no GC).

Os resultados da duplicata (A1 e A2) da amostra 2 (média de duas injeções, cada) são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Resultados da duplicata da Amostra 2 MOSH e MOAH.

MOSH	Replicata A1	Replicata A2	Média	S	N	t (95%)	IC (95%)
Nº de Carbonos (intervalo)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)			Conc. (mg/kg)
C16 a C25	24,1	25,5	24,8	1,0	4	3,18	1,6
C25 a C35	5,2	5,1	5,1	0,0	4	3,18	0,1

MOAH	Replicata A1	Replicata A2	Média	S	N	t (95%)	IC (95%)
Nº de Carbonos (intervalo)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)			Conc. (mg/kg)
C16 a C25	12,0	30,3	21,1	13,0	4	3,18	20,6
C25 a C35	≤ 5,7 ⁽¹⁾	≤ 5,7 ⁽¹⁾	≤ 5,7 ⁽¹⁾	⁽²⁾	4	3,18	⁽²⁾

S: desvio-padrão; N: nº de replicatas; $t_{(N-1, 1-\alpha)}$: t de Student; IC: Intervalo de confiança.

(1) $LQ_{(MOAH\ C25-C35)}$: 5,7 mg/kg.

(2) Não se aplica.

A seguir estão apresentados, na Tabela 10, os dados necessários para o cálculo do z'-score de cada intervalo (C16 a C25 e C25 a C35) de concentração das frações MOSH e MOAH na amostra 2. Os dados completos do ensaio interlaboratorial estão apresentados no anexo 3 (tabelas V – VIII).

Tabela 10 – Dados utilizados no cálculo do z-score (Amostra 2)

		m_{best}	$\pm IC$ (95,5%)	S_{best}	S_M
Intervalo MOSH Amostra 1	C16 a C25	24,1	3,3	7,9	0,8
	C25 a C35	5,6	1,2	2,6	0,1

		m_{best}	$\pm IC$ (95,5%)	S_{best}	S_M
Intervalo MOAH Amostra 1	C16 a C25	18,6	3,4	7,9	0,9
	C25 a C35	4,6	1,9	3,8	0,2

A Tabela 11 a seguir mostra a performance do método para a amostra 2.

Tabela 11 – Performance do método para a Amostra 2 do ensaio interlaboratorial.

Faixa (nº de carbonos)	A1 (mg/kg)	A2 (mg/kg)	Média (mg/kg)	Z'-score	Performance
MOSH (C16-C25)	24,1	25,5	24,8	0,05	Satisfatória
MOSH (C25-C35)	5,2	5,1	5,1	-0,16	Satisfatória
MOAH (C16-C25)	12,0	30,3	21,1	0,29	Satisfatória
MOAH (C25-C35)	$\leq 5,7$	$\leq 5,7$	$\leq 5,7$	-1,28	Satisfatória

LQ_(MOAH C25-C35): 5,7 mg/kg. Valor utilizado no cálculo do z-score.

A região C25-C35 da fração MOAH apresentou performance questionável, para a amostra 1, pelo método manual. Quatro dos dez laboratórios que usaram o método manual do BfR, (2012) com GC-FID apresentaram performance não satisfatória. Um laboratório (Nº 24) que não usou o método manual apresentou performance não satisfatória também. No entanto, para a amostra 2 a performance do método foi satisfatória para todos os intervalos de nº de carbonos (*vide* Anexos 2 e 3).

Os principais cromatogramas das amostras 1 e 2 da análise interlaboratorial encontram-se nos Anexos 4 e 5 respectivamente.

O método se mostrou adequado para análise de cartões de material reciclado e fibra virgem, porém deve-se dar uma atenção especial para a determinação da fração MOAH, principalmente de C25-C35.

6.2. Amostras de Aparas

6.2.1. Pré-Consumo (AP1)

Foi analisada uma amostra de aparas pré-consumo, e os resultados encontrados são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 – Resultados obtidos para a amostra de aparas pré-consumo.

MOSH	Replicata A1	Replicata A2	Replicata A3	Média	S	N	t (95%)	IC (95%)
Nº de Carbonos (intervalo)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)			Conc. (mg/kg)
C16 a C25	36,6	38,6	35,5	36,9	1,6	6	2,57	1,7
C25 a C35	≤ 4,6 ⁽¹⁾	≤ 4,6 ⁽¹⁾	≤ 4,6 ⁽¹⁾	≤ 4,6 ⁽¹⁾	⁽²⁾	6	2,57	⁽²⁾

MOAH	Replicata A1	Replicata A2	Replicata A3	Média	S	N	t (95%)	IC (95%)
Nº de Carbonos (intervalo)	Conc. (mg/kg)			Conc. (mg/kg)				
C16 a C25	31,5	23,5	32,2	29,1	4,8	6	2,57	5,1
C25 a C35	26,3	15,5	23,6	21,8	5,7	6	2,57	5,9

S: desvio-padrão; N: nº de replicatas; $t_{(N-1, 1-\alpha)}$: t de Student; IC: Intervalo de confiança.

(1) $LQ_{(MOSH\ C25-C35)}$: 4,6 mg/kg.

(2) Não se aplica.

6.2.2. Pós-Consumo (AP2)

Foi analisada uma amostra de aparas pós-consumo, e os resultados encontrados são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 – Resultados obtidos para a amostra de aparas pós-consumo.

MOSH	Replicata A1	Replicat a A2	Replicat a A3	Média	S	N	t (95%)	IC (95%)
Nº de Carbonos (intervalo)	Conc. (mg/kg)			Conc. (mg/kg)				
C16 a C25	215,9	77,2	105,9	133,0	73,3	6	2,57	76,9
C25 a C35	289,4	92,7	136,0	172,7	103,4	6	2,57	108,5

MOAH	Replicata A1	Replicat a A2	Replicat a A3	Média	S	N	t (95%)	IC (95%)
Nº de Carbonos (intervalo)	Conc. (mg/kg)			Conc. (mg/kg)				
C16 a C25	125,2	42,5	92,2	86,6	41,6	6	2,57	43,7
C25 a C35	144,1	47,7	110,1	100,6	48,9	6	2,57	51,3

S: desvio-padrão; N: nº de replicatas; $t_{(N-1, 1-\alpha)}$: t de Student; IC: Intervalo de confiança.

As aparas pós-consumo apresentaram maiores concentrações de MOSH e MOAH, nos dois intervalos avaliados (C16-C25 e C25-C35), do que as aparas pré-consumo. As aparas pós-consumo apresentaram maiores concentrações de óleo mineral do que as aparas pré-consumo. Como foi analisada somente uma amostra de cada apara não foi possível estabelecer se esses resultados representam a situação das aparas pré e pós-consumo.

Contudo, as aparas pré-consumo apresentaram maiores porcentagem de MOAH do que as aparas pós-consumo: MOAH (54%)_{pré}, MOAH (38%)_{pós}; MOAH_(C16-C25) (44%)_{pré}, MOAH_(C16-C25) (39%)_{pós}; MOAH_(C25-C35) (76%)_{pré}, MOAH_(C25-C35) (37%)_{pós}.

6.3. Amostras de Cartão

6.3.1. Cartão tipo 1

Foram analisadas três amostras de cartão tipo 1, composto por 51% de aparas pré-consumo, produzidos em três épocas distintas 1, 2 e 3 e que foram identificadas como amostras 1(A), 1 (B) e 1(C), respectivamente. Os resultados encontrados são apresentados nas Tabelas 14, 15 e 16.

Tabela 14 – Resultados obtidos para a amostra de cartão 1(A).

MOSH	Replicata A1	Replicata A2	Replicata A3	Média	S	N	t (95%)	IC (95%)
Nº de Carbonos (intervalo)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)			Conc. (mg/kg)
C16 a C25	28,0	32,4	36,5	32,3	4,3	6	2,57	4,5
C25 a C35	≤ 4,6 ⁽¹⁾	≤ 4,6 ⁽¹⁾	≤ 4,6 ⁽¹⁾	≤ 4,6 ⁽¹⁾	⁽²⁾	6	2,57	⁽²⁾

MOAH	Replicata A1	Replicata A2	Replicata A3	Média	S	N	t (95%)	IC (95%)
Nº de Carbonos (intervalo)	Conc. (mg/kg)			Conc. (mg/kg)				
C16 a C25	52,0	28,5	40,2	40,3	11,8	6	2,57	12,3
C25 a C35	14,3	6,6	10,4	10,5	3,9	6	2,57	4,1

S: desvio-padrão; N: nº de replicatas; $t_{(N-1, 1-\alpha)}$: t de Student; IC: Intervalo de confiança.

(1) $LQ_{(MOSH\ C25-C35)}$: 4,6 mg/kg.

(2) Não se aplica.

Tabela 15 – Resultados obtidos para a amostra de cartão 1(B).

MOSH	Replicata A1	Replicata A2	Replicata A3	Média	S	N	t (95%)	IC (95%)
Nº de Carbonos (intervalo)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)			Conc. (mg/kg)
C16 a C25	18,4	18,4	16,2	17,7	1,3	6	2,57	1,3
C25 a C35	≤ 4,6 ⁽¹⁾	≤ 4,6 ⁽¹⁾	≤ 4,6 ⁽¹⁾	≤ 4,6 ⁽¹⁾	⁽³⁾	6	2,57	⁽³⁾

MOAH	Replicata A1	Replicata A2	Replicata A3	Média	S	N	t (95%)	IC (95%)
Nº de Carbonos (intervalo)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)			Conc. (mg/kg)
C16 a C25	33,4	14,5	35,3	27,8	11,5	6	2,57	12,0
C25 a C35	10,5	≤ 5,7 ⁽²⁾	14,3	10,2	4,3	6	2,57	4,5

S: desvio-padrão; N: nº de replicatas; $t_{(N-1, 1-\alpha)}$: t de Student; IC: Intervalo de confiança.

(1) $LQ_{(MOSH\ C25-C35)}$: 4,6 mg/kg.

(2) $LQ_{(MOAH\ C25-C35)}$: 5,7 mg/kg.

(3) Não se aplica.

Tabela 16 – Resultados obtidos para a amostra de cartão 1(C).

MOSH	Replicata A1	Replicata A2	Replicata A3	Média	S	N	t (95%)	IC (95%)
Nº de Carbonos (intervalo)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)			Conc. (mg/kg)
C16 a C25	19,0	14,6	9,6	14,4	4,7	6	2,57	4,9
C25 a C35	≤ 4,6 ⁽¹⁾	≤ 4,6 ⁽¹⁾	≤ 4,6 ⁽¹⁾	≤ 4,6 ⁽¹⁾	(3)	6	2,57	(3)

MOAH	Replicata A1	Replicata A2	Replicata A3	Média	S	N	t (95%)	IC (95%)
Nº de Carbonos (intervalo)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)			Conc. (mg/kg)
C16 a C25	20,1	36,2	24,9	27,1	8,2	6	2,57	8,6
C25 a C35	≤ 5,7 ⁽²⁾	9,3	6,7	7,2	1,9	6	2,57	1,9

S: desvio-padrão; N: nº de replicatas; $t_{(N-1, 1-\alpha)}$: t de Student; IC: Intervalo de confiança.

(1) $LQ_{(MOSH\ C25-C35)}$: 4,6 mg/kg.

(2) $LQ_{(MOAH\ C25-C35)}$: 5,7 mg/kg.

(3) Não se aplica.

A Figura 2 mostra a influência da época de produção do cartão na concentração de MOSH e MOAH de C16-C25 e C25-C35 para o cartão tipo 1.

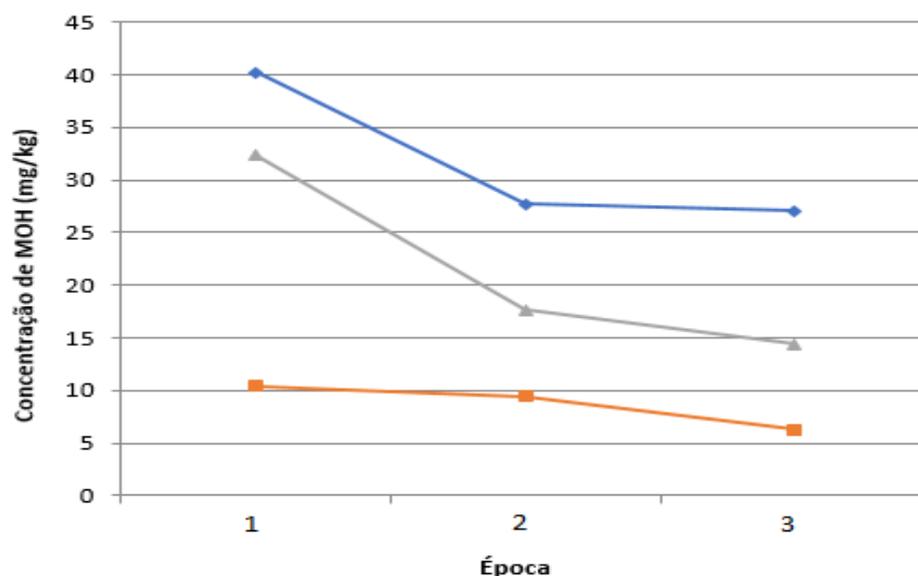


Figura 2 – Influência da época de produção do cartão tipo 1 na concentração de óleo mineral determinada no cartão. **MOAH_(C16-C25)** (linha azul); **MOSH_(C16-C25)** (linha cinza); **MOAH_(C25-C35)** (linha laranja).

A análise estatística indicou que há diferença significativa (Figura 2), para $MOSH_{(C16-C25)}$ e $MOAH_{(C16-C25)}$, entre os resultados obtidos na época 1 e os obtidos nas épocas 2 e 3, mas não há diferença significativa entre os resultados observados nas épocas 2 e 3. Essas variações entre as épocas de produção do cartão possivelmente estão relacionadas com a origem da apara pré-consumo utilizada.

Para a fração $MOAH_{(C25-C35)}$ não foi observada diferença significativa entre as épocas. Assim como não foi observada diferença significativa na concentração de $MOSH_{(C25-C35)}$ em relação às épocas 1, 2 e 3. Em todas as épocas essa fração ficou abaixo do limite de quantificação.

6.3.2. Cartão tipo 2

Foram analisadas três amostras de cartão tipo 2, composto por 26% de uma mistura de aparas pré e pós-consumo, produzidos em três épocas distintas 1, 2 e 3 e que foram identificadas como amostras 2(A), 2(B) e 2(C), respectivamente. Os resultados encontrados são apresentados nas Tabelas 17, 18 e 19.

Tabela 17 – Resultados obtidos para a amostra de cartão 2(A).

MOSH	Replicata A1	Replicata A2	Replicata A3	Média	S	N	t (95%)	IC (95%)
Nº de Carbonos (intervalo)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)			Conc. (mg/kg)
C16 a C25	8,6	7,6	9,3	8,5	0,9	6	2,57	0,9
C25 a C35	≤ 4,6 ⁽¹⁾	≤ 4,6 ⁽¹⁾	≤ 4,6 ⁽¹⁾	≤ 4,6 ⁽¹⁾	(3)	6	2,57	(3)

MOAH	Replicata A1	Replicata A2	Replicata A3	Média	S	N	t (95%)	IC (95%)
Nº de Carbonos (intervalo)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)			Conc. (mg/kg)
C16 a C25	16,9	27,0	26,7	23,5	5,8	6	2,57	6,1
C25 a C35	≤ 5,7 ⁽²⁾	7,6	6,9	6,7	1,0	6	2,57	1,0

S: desvio-padrão; N: nº de replicatas; $t_{(N-1, 1-\alpha)}$: t de Student; IC: Intervalo de confiança.

1) $LQ_{(MOSH\ C25-C35)}$: 4,6 mg/kg.

(2) $LQ_{(MOAH\ C25-C35)}$: 5,7 mg/kg.

(3) Não se aplica.

Tabela 18 – Resultados obtidos para a amostra de cartão 2(B).

MOSH	Replicata A1	Replicata A2	Replicata A3	Média	S	N	t (95%)	IC (95%)
Nº de Carbonos (intervalo)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)			Conc. (mg/kg)
C16 a C25	10,0	19,7	13,5	14,4	4,9	6	2,57	5,2
C25 a C35	≤ 4,6 ⁽¹⁾	≤ 4,6 ⁽¹⁾	≤ 4,6 ⁽¹⁾	≤ 4,6 ⁽¹⁾	(2)	6	2,57	(2)

MOAH	Replicata A1	Replicata A2	Replicata A3	Média	S	N	t (95%)	IC (95%)
Nº de Carbonos (intervalo)	Conc. (mg/kg)			Conc. (mg/kg)				
C16 a C25	21,1	44,3	33,8	33,1	11,6	6	2,57	12,2
C25 a C35	7,3	27,3	15,3	16,6	10,1	6	2,57	10,6

S: desvio-padrão; N: nº de replicatas; $t_{(N-1, 1-\alpha)}$: t de Student; IC: Intervalo de confiança.

1) $LQ_{(MOSH\ C25-C35)}$: 4,6 mg/kg.

(2) Não se aplica

Tabela 19 – Resultados obtidos para a amostra de cartão 2(C).

MOSH	Replicata A1	Replicata A2	Replicata A3	Média	S	N	t (95%)	IC (95%)
Nº de Carbonos (intervalo)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)			Conc. (mg/kg)
C16 a C25	9,5	9,8	8,7	9,3	0,6	6	2,57	0,6
C25 a C35	≤ 4,6 ⁽¹⁾	≤ 4,6 ⁽¹⁾	≤ 4,6 ⁽¹⁾	≤ 4,6 ⁽¹⁾	(3)	6	2,57	(3)

MOAH	Replicata A1	Replicata A2	Replicata A3	Média	S	N	t (95%)	IC (95%)
Nº de Carbonos (intervalo)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)			Conc. (mg/kg)
C16 a C25	26,4	24,6	8,1	19,7	10,1	6	2,57	10,6
C25 a C35	13,4	13,1	≤ 5,7 ⁽²⁾	10,7	4,4	6	2,57	4,6

S: desvio-padrão; N: nº de replicatas; $t_{(N-1, 1-\alpha)}$: t de Student; IC: Intervalo de confiança.

1) $LQ_{(MOSH\ C25-C35)}$: 4,6 mg/kg.

(2) $LQ_{(MOAH\ C25-C35)}$: 5,7 mg/kg.

(3) Não se aplica

A Figura 3 mostra a influência da época de produção do cartão na concentração de MOSH e MOAH de C16-C25 e C25-C35 para o cartão tipo 2.

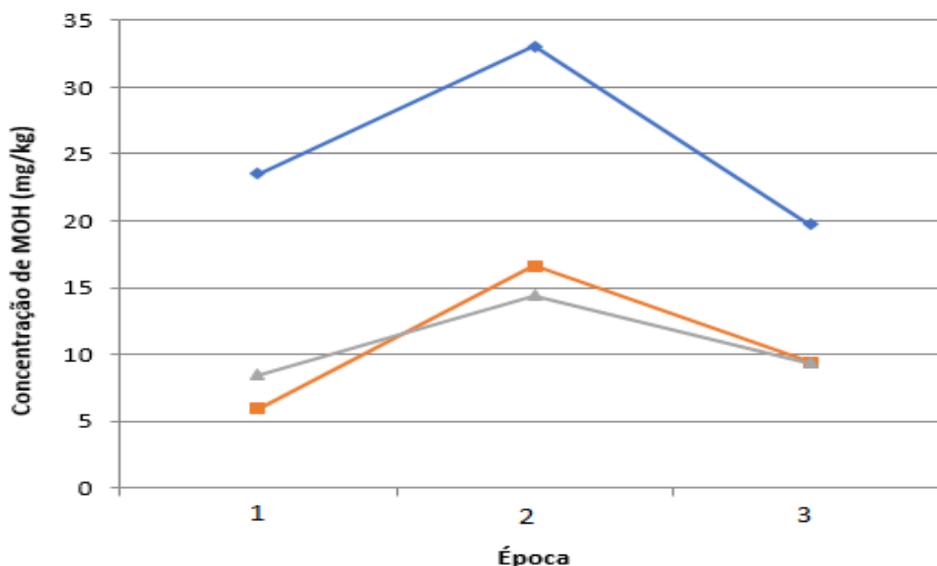


Figura 3 – Influência da época de produção do cartão tipo 2 na concentração de óleo mineral determinada no cartão. **MOAH_(C16-C25)** (linha azul); **MOSH_(C16-C25)** (linha cinza); **MOAH_(C25-C35)** (linha laranja).

A análise estatística indicou que há diferença significativa (Figura 3), para MOSH e MOAH de C16-C25 e para MOAH de C25-C35, entre os resultados obtidos na época 2 em relação as épocas 1 e 3, mas não há diferença significativa entre os resultados obtidos nas épocas 1 e 3.

Não foi observada diferença significativa em relação às épocas 1, 2 e 3 na concentração de MOSH_(C25-C35). Em todas as épocas essa fração ficou abaixo do limite de quantificação.

6.3.3. Fibra Virgem Época 2

Foi analisada uma amostra de cartão tipo 3, composto por 100% de fibra virgem e produzido na época 2, e os resultados encontrados são apresentados na Tabela 20.

Tabela 20 – Resultados obtidos para a amostra de cartão 3(A).

MOSH	Replicata A1	Replicata A2	Replicata A3	Média	S	N	t (95%)	IC (95%)
Nº de Carbonos (intervalo)	Conc. (mg/kg)			Conc. (mg/kg)				
C16 a C25	17,2	11,8	19,2	16,0	3,8	6	2,57	4,0
C25 a C35	5,4	4,2	6,5	5,4	1,2	6	2,57	1,2

MOAH	Replicata A1	Replicata A2	Replicata A3	Média	S	N	t (95%)	IC (95%)
Nº de Carbonos (intervalo)	Conc. (mg/kg)			Conc. (mg/kg)				
C16 a C25	6,1	9,0	15,7	10,3	4,9	6	2,57	5,2
C25 a C35	≤ 5,7	≤ 5,7	≤ 5,7	≤ 5,7	(2)	6	2,57	(2)

S: desvio-padrão; N: nº de replicatas; $t_{(N-1, 1-\alpha)}$: t de Student; IC: Intervalo de confiança.

$LQ_{(MOAH\ C25-C35)}$: 5,7 mg/kg.

(2) Não se aplica.

6.3.4. Fibra Virgem Época 3

Os resultados encontrados para a amostra de cartão tipo 3, composto por 100% de fibra virgem (celulose e pasta de alto rendimento) e produzido na época 3 são apresentados na Tabela 21.

Tabela 21 – Resultados obtidos para a amostra de cartão 3(B).

MOSH	Replicata A1	Replicata A2	Replicata A3	Média	S	N	t (95%)	IC (95%)
Nº de Carbonos (intervalo)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)	Conc. (mg/kg)			Conc. (mg/kg)
C16 a C25	9,5	6,0	14,2	9,9	4,2	6	2,57	4,4
C25 a C35	≤ 4,6 ⁽¹⁾	≤ 4,6 ⁽¹⁾	≤ 4,6 ⁽¹⁾	≤ 4,6 ⁽¹⁾	(3)	6	2,57	(3)

MOAH	Replicata A1	Replicata A2	Replicata A3	Média	S	N	t (95%)	IC (95%)
Nº de Carbonos (intervalo)	Conc. (mg/kg)			Conc. (mg/kg)				
C16 a C25	18,3	(4)	15,4	16,8	2,1	4	3,18	3,3
C25 a C35	≤ 5,7	≤ 5,7	≤ 5,7	≤ 5,7	(3)	4	3,18	(3)

S: desvio-padrão; N: nº de replicatas; $t_{(N-1, 1-\alpha)}$: t de Student; IC: Intervalo de confiança.

1) $LQ_{(MOSH\ C25-C35)}$: 4,6 mg/kg.

(2) $LQ_{(MOAH\ C25-C35)}$: 5,7 mg/kg.

(3) Não se aplica.

(4) Replicata desconsiderada.

Foi desconsiderada a replicata A2 MOAH porque houve problema durante o procedimento de SPE, e na obtenção do extrato concentrado.

A Tabela 22 apresenta um resumo geral dos resultados das amostras analisadas.

O cartão 3(A), 100% de fibra virgem, apresentou mais MOSH (21,4 mg/kg) do que MOAH (16mg/kg). Já o cartão 3(B), cartão de fibra virgem (mistura de celulose e pasta de alto rendimento) apresentou mais MOAH (22,5 mg/kg) do que MOSH (14,6 mg/kg). Esses valores de MOAH não eram esperados em cartão de fibra virgem, apesar de ser possível encontrar uma pequena quantidade. A origem do MOH no cartão de fibra virgem deveria ser estudada, por exemplo, com a análise dos insumos do cartão como a polpa de celulose. O óleo mineral pode ser usado como antiespumante na fabricação de cartões sendo uma fonte de contaminação do cartão virgem.

Dos cartões que possuem aparas em sua composição, o cartão 1(A) foi o que apresentou a maior quantidade de óleo mineral (87,7 mg/kg). Os cartões tipo 1 possuem maior porcentagem de aparas em sua composição, (sendo apenas pré-consumo). As aparas pré-consumo são impressas e são provenientes de material rejeitado por gráficas. O óleo mineral pode estar presente em tintas de impressão usadas em embalagens, como as tintas para impressão off-set e, portanto, é esperado que contenham maiores quantidades de MOH.

Já o cartão 2(A), que possui uma mistura de aparas pré e pós-consumo em sua composição, foi o que apresentou a menor concentração de óleo mineral (43,3 mg/kg), entre os cartões estudados.

Para as aparas pós-consumo, o valor determinado de óleo mineral total é da ordem de 500 mg/kg, porém não foi possível avaliar a sua influência no valor total de MOH encontrados nas amostras de cartão tipo 2. A apara pós-consumo é principalmente papelão ondulado que pode ou não ser impresso, entretanto, a contaminação pode vir de outros insumos utilizados na fabricação de caixas de papelão ondulado, assim como podem ser provenientes de contaminações em seu uso prévio e também do sistema de coleta e separação do material a ser reciclado.

Ainda há muita discussão sobre a definição da quantidade de óleo mineral que pode estar presente em embalagens para alimentos. O Ministério Alemão de Nutrição, Agricultura e Proteção ao Consumidor (BMELV) publicou em julho de 2014, um novo projeto de lei estabelecendo limites máximos para resíduos de óleo mineral em embalagens de alimentos feitas de papel, cartão ou papelão de fibras recicladas. Estabeleceu-se limites máximos para MOSH (24 mg/kg) e para MOAH (6 mg/kg) na faixa C16–C25 para contato com alimentos secos e não oleosos ou C16–C35 para contato com alimentos úmidos.

Os resultados obtidos para o MOSH na faixa de C16-C25 foram abaixo do limite estabelecido pelo BMELV, com exceção da amostra 1(A) que apresentou concentração de $MOSH_{(C16-C25)}$ e de $MOSH_{(total)}$ acima de 24 mg/kg na época 1 de coleta da amostra.

A análise estatística mostrou que há influência da época de coleta da amostra. A amostra 1(A), época 1, foi estatisticamente diferente das amostras 1(B) e 1(C), épocas 2 e 3 de coleta, respectivamente. Apesar das amostras terem a mesma proporção de aparas pré-consumo é possível encontrar valores diferentes de MOH, pois as aparas pré-consumo podem ser originárias de diferentes gráficas, ter impressões diferentes, composição de tintas diferentes entre outros aspectos. Para as amostras de cartão tipo 2, apesar de apresentarem também diferença significativa entre as épocas de coleta, a época 2, cartão 2(B), é diferente estatisticamente das épocas 1 e 3, cartões 2(A) e 2(C), respectivamente. Nos cartões tipo 2, os valores encontrados para todas as épocas foram abaixo de 24 mg/kg $MOSH_{(C16-C25)}$ e de $MOSH_{(total)}$.

Todas as amostras de cartão, inclusive os de fibra virgem, apresentaram concentração de $MOAH_{(C16-C25)}$ e de $MOAH_{(total)}$ acima de 6 mg/kg.

É importante ressaltar que o BMELV indica que quando os limites máximos nos materiais de embalagem são excedidos, o material não necessariamente deve ser descartado para contato com alimentos. Recomenda-se a análise de migração específica do óleo mineral para o alimento desde que essa migração apresente valores inferiores a 2 mg/kg de alimento para MOSH C20–C35 e 0,5 mg/kg para MOAH C16–C35.

Biedermann e Grob (2010), em estudo realizado com análises bidimensionais CG-CG, mostraram que em geral os óleos minerais encontrados em cartão reciclado contêm de 15 a 25% de compostos aromáticos, predominantemente com 1 a 3 anéis aromáticos. Porém, não foi observada esta tendência nos cartões analisados. Observou-se uma maior participação de hidrocarbonetos aromáticos do que saturados em quase todas as amostras de cartão analisadas, com exceção do cartão 3(A) de fibra virgem. Observou-se que a porcentagem de compostos aromáticos, em cartões que possuem material reciclado em sua composição, variou de 58%, para o cartão 1(A), a 72%, para o cartão 2(B).

Na análise interlaboratorial a tendência de se encontrar mais MOSH do que MOAH foi observada para as amostras 1 e 2.

A comparação estatística das frações de MOSH e MOAH nas faixas de número de carbonos de 16-25 e 25-35 das amostras de cartão tipo 1 e tipo 2 mostrou que em todas as análises a fração de MOAH (C16-C25) foi a maior e diferiu significativamente das demais frações (Figuras 2 e 3).

Tabela 22 – Resumo dos resultados de concentração (mg/kg) de MOSH e MOAH nos intervalos de integração de C16-C25 e C25-C35, com intervalo de confiança de 95%, e MOSH e MOAH totais, bem como o total de óleo mineral (MOH).

Amostra	MOSH C16 a C25 (± IC 95%)	MOSH C25 a C35 (± IC 95%)	MOSH (total)	MOAH C16 a C25 (± IC 95%)	MOAH C25 a C35 (± IC 95%)	MOAH (total)	MOH (total)
1(A) 51% Pré-consumo (1)	32,3 ± 4,5	4,6 (LQ)	36,9	40,3 ± 12,3	10,5 ± 4,1	50,8	87,7
1(B) 51% Pré-consumo (2)	17,7 ± 1,3	4,6 (LQ)	22,3	27,8 ± 12,0	10,2 ± 4,5	38,0	60,3
1(C) 48% Pré-consumo (3)	14,4 ± 4,9	4,6 (LQ)	19,0	27,1 ± 8,6	7,2 ± 1,9	34,3	53,3
2(A) 29% Pré/Pós- consumo (1)	8,5 ± 0,9	4,6 (LQ)	13,1	23,5 ± 6,1	6,7 ± 1,0	30,2	43,3
2(B) 26% Pré/Pós- consumo (2)	14,4 ± 5,2	4,6 (LQ)	19,0	33,1 ± 12,2	16,6 ± 10,6	49,7	68,7
2(C) 26% Pré/Pós- consumo (3)	9,3 ± 0,6	4,6 (LQ)	13,9	19,7 ± 10,6	10,7 ± 4,6	30,4	44,3
3(A) 100% Fibra Virgem (2)	16,0 ± 4,0	5,4 ± 1,2	21,4	10,3 ± 5,2	5,7 (LQ)	16,0	37,4
3(B) 100% Fibra Virgem (3)	9,9 ± 4,4	4,6 (LQ)	14,5	16,8 ± 3,3	5,7 (LQ)	22,5	37,0
(AP1) Aparas Pré- consumo (3)	36,9 ± 1,7	4,6 (LQ)	41,5	29,1 ± 5,1	21,8 ± 5,9	50,9	92,4
(AP2) Aparas Pós- consumo (3)	133,0 ± 76,9	172,7 ± 108,5	305,7	86,6 ± 43,7	100,6 ± 51,3	187,2	492,9

7. CONCLUSÕES

O método se mostrou adequado para análise de cartões com fibra virgem e com material reciclado, além de aparas pré e pós-consumo. A análise de MOH é trabalhosa, demorada e com muitas etapas que possibilitam a adição de contaminantes que podem influenciar os resultados, o que exige cuidados desde a lavagem do material de laboratório até a finalização quando a amostra é injetada no cromatógrafo a gás. No método off-line a etapa mais crítica é a de concentração da amostra. Foram testados dois métodos de concentração, com fluxo de N₂ (g) e rota-evaporação, sendo que a menor perda de padrões foi obtida com o rota-evaporador.

A época de produção do cartão influencia no teor de óleo mineral encontrado. A composição do cartão em relação à quantidade e tipo de aparas determina a quantidade de MOH no material. Os resultados mostram que o teor de MOH nas aparas pré-consumo não é homogêneo e depende da sua origem.

Não foi possível avaliar a influência das aparas pós-consumo no teor de MOH determinado nas amostras analisadas porque não foram analisadas amostras com diferentes porcentagens de aparas pós-consumo misturadas com fibra virgem.

8. RECOMENDAÇÕES

Recomenda-se realizar ensaio de migração específica de MOH quando os valores recomendados pelo BMELV para material (cartão, papel ou papelão ondulado) se excederem. O material pode ser aceito desde que a migração apresente valores inferiores a 2 mg/kg de alimento para MOSH C20–C35 e 0,5 mg/kg para MOAH C16–C35.

Recomenda-se em um estudo futuro uma investigação mais aprofundada nas possíveis fontes de contaminação do cartão produzido com fibras virgens, como análise da chapa de celulose recebida para a produção do cartão além de outros insumos. Recomenda-se também o monitoramento através de análises das aparas pré-consumo para avaliação prévia da contaminação de MOH no material recebido.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGILENT TECHNOLOGIES. **Agilent multimode inlet**. Large volume injection tutorial. Wilmington, DE: Agilent Technologies, Inc., 2009. G3510-90020.

ANDREÃO, Patrícia S. S. *et al.* Utilização e recuperação de sílica gel impregnada com nitrato de prata. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 212-215, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422010000100036>.

BARP, Laura *et al.* Mineral oil in human tissues. Part I: concentrations and molecular mass distributions. **Food and Chemical Toxicology**, v. 72, p. 312-321, out. 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2014.04.029>.

BIEDERMANN, Maurus; FISELIER, Katell; GROB, Koni. Aromatic hydrocarbons of mineral oil origin in foods: method for determining the total concentration and first results. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 19, p. 8711-8721, out. 2009. Disponível em; <http://dx.doi.org/10.1021/jf901375e>.

BIEDERMANN, Maurus; GROB, Koni. Comprehensive two-dimensional gas chromatography for characterizing mineral oils in foods and distinguishing them from synthetic hydrocarbons. **Journal Of Chromatography A**, v. 1375, p. 146-153, jan. 2015. Disponível em; <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.11.064>.

BIEDERMANN, Maurus; GROB, Koni. Comprehensive two-dimensional GC after HPLC preparation for the characterization of aromatic hydrocarbons of mineral oil origin in contaminated sunflower oil. **Journal of Separation Science**, v. 32, n. 21, p. 3726-3737, nov. 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.200900366>.

BIEDERMANN, Maurus; GROB, Koni. Is recycled newspaper suitable for food contact materials? Technical grade mineral oils from printin. **European Food Research and Technology**, v. 230, n. 5, p. 785-796, fev. 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-010-1223-9>.

BIEDERMANN, Maurus; GROB, Koni. On-line coupled high performance liquid chromatography–gas chromatography for the analysis of contamination by mineral oil. Part 1: method of analysis. **Journal of Chromatography A**, v.

1255, p.56-75, set. 2012 a. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.05.095>.

BIEDERMANN, Maurus; GROB, Koni. On-line coupled high performance liquid chromatography–gas chromatography for the analysis of contamination by mineral oil. Part 2: Migration from paperboard into dry foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1255, p. 76-99, set. 2012 b. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.05.096>.

BIEDERMANN-BREM, S. *et al.* Migration of polyolefin oligomeric saturated hydrocarbons (POSH) into food. **Food Additives & Contaminants: Part A**, p. 1-12, dez. 2011. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2011.641164>.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 88, de 29 de junho de 2016. Aprova o regulamento técnico sobre materiais, embalagens e equipamentos celulósicos destinados a entrar em contato com alimentos e dá outras providências. Disponível em:

http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2883670/%281%29RDC_88_2016.pdf/b6eb3585-1294-42a5-9b01-69133446781f; Acesso em: 25 jan. 2019.

BRASIL. Ministério da Economia. CAMEX. Resolução nº 71, de 12 de setembro de 2013. Homologa compromisso de preço, por um prazo de até 5 (cinco) anos, relativo às importações brasileiras de cartões duplex e triplex, originárias da República do Chile Disponível em:

<http://www.camex.gov.br/component/content/article/62-resolucoes-da-camex/em-vigor/1244-resolucao-n-71-de-12-de-setembro-de-2013>. Acesso em: 26 maio 2019.

BUNDESMINISTERIUM FÜR ERNÄHRUNG UND LANDWIRTSCHAFT (BMELV) – **Vorblatt Zweiundzwanzigste Verordnung zur Änderung der Bedarfsgegenständeverordnung**. Stand: 24.07.2014. Disponível em:

https://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/Service/Rechtsgrundlagen/Entwurfe/Entwurf22VerordnungBedarfsgegenstaende.pdf?__blob=publicationFile.

BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG – BfR. **Übergänge von Mineralöl aus Verpackungsmaterialien auf Lebensmittel**. Stellungnahme Nr. 008/2010 des BfR vom 09. Dez. 2009. Berlin: BfR, 2009. Disponível em: http://www.bfr.bund.de/cm/343/uebergaenge_von_mineraloel_aus_verpackungsmaterialien_auf_lebensmittel.pdf. Acesso em: 02 maio 2017.

BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG – BfR (German Federal Institute for Risk Assessment), 2011. 7. **Sitzung der BfR Kommission für Bedarfsgegenstände**. Protokoll der Sitzung vom 14. Apr. 2011. 9 p. Disponível em: http://www.bfr.bund.de/cm/343/7_sitzung_der_bfr_kommission_fuer_bedarfsgegenstaende.pdf.

BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG – BfR. **Bestimmung von Kohlenwasserstoffen aus Mineralöl (MOSH und MOAH) oder Kunststoffen (POSH, PAO) in Verpackungsmaterialien und trockenen Lebensmitteln mittels Festphasenextraktion und GC-FID**. Berlin: BfR, 2012. Disponível em: <http://www.bfr.bund.de/cm/343/bestimmung-von-kohlenwasserstoffen-aus-mineraloel-oderkunststoffen.pdf>. Acesso em: 09 maio 2017.

CARPENTER, C. H. *et al.* **Papermaking fibers**. New York: State University College of Forest at Syracuse University, 1963.

COLLINS, Carol H.; BRAGA, Gilberto L.; BONATO, Pierina S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, 2006.

COMISSÃO EUROPEIA. Recomendação (UE) 2017/84 de 16 de janeiro de 2017, relativa à monitorização de hidrocarbonetos de óleos minerais nos alimentos e em materiais e objetos destinados a entrar em contacto com os alimentos. **Jornal Oficial da União Europeia**, Bruxelas, L.12, 01 jan. 2017. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32017H0084&from=EN>. Acesso em: 16 abr. 2017.

CONCIN, Nicole *et al.* Mineral oil paraffins in human body fat and milk. **Food And Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 544-552, fev. 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2007.08.036>.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Scientific opinion on mineral oil hydrocarbons in food; EFSA panel on contaminants in the food chain (CONTAM). **EFSA Journal**, Parma, v. 10, n. 6, p. 2704, 2012.

FENGLER, Romy. Determination of MOSH and MOAH in bakery bags and worst-case estimation of the underlying migration potential into pastry products. *In*: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FOOD PACKAGING: SCIENTIFIC DEVELOPMENTS SUPPORTING SAFETY AND INNOVATION , 6., 2016, Barcelona. **Proceedings [...]**. Germany: Fraunhofer Institute for Process Engineering and Packaging (IVV), 2016.

FISELIER, Katell *et al.* Development of a manual method for the determination of mineral oil in foods and paperboard. **Journal Of Chromatography A**, v. 1271, n. 1, p. 192-200, jan. 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.11.034>.

GROB, Koni. Update on recycled paperboard and its compliance for food contact. **Journal Für Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit**, v. 9, n. 3, p. 213-219, jun. 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00003-014-0903-y>.

GROB, Konrad; KAELIN, Iren; ARTHO, Anna. Coupled LC-GC: the capacity of silica gel (HP)LC columns for retaining fat. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 14, n. 6, p. 373-376, jun. 1991. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/jhrc.1240140604>.

GRUNDBÖCK, Florian *et al.* Mineral oil in sunflower seeds: the sources. **European Food Research and Technology**, v. 231, n. 2, p. 209-213, 10 abr. 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-010-1264-0>.

INMETRO. Coordenação Geral de Acreditação. **DOQ-CGCRE-008**: orientação sobre validação de métodos analíticos. Rio de Janeiro, jul. 2018. 28 p. Revisão nº 07. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/pesquisa_link.asp?seq_tipo_documento=5&co_d_uo_numeracao=00774&num_documento=008. Acesso em: 03 jul. 2019.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Mineral oils, untreated and mildly-treated oils (Group 1), Highly-refined oils (Group 3)**. Summaries & Evaluation, 1987. Suppl. 7.

JAMNICKI, Sonja *et al.* Deinking possibilities in the reduction of mineral oil hydrocarbons from recovered paper grades. **Cellulose Chemistry and Technology**, Zagreb, v. 49, p. 677-684, jul./ago. 2015. Disponível em: [http://www.cellulosechemtechnol.ro/pdf/CCT7-8\(2015\)/p.677-684.pdf](http://www.cellulosechemtechnol.ro/pdf/CCT7-8(2015)/p.677-684.pdf). Acesso em: 24 ago. 2017.

LANÇAS, Fernando M. **Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE**. Campinas: Átomo, 2009.

LANÇAS, Fernando M. **Extração em fase sólida (SPE)**. Campinas: Rima, 2004.

LI, Bingning *et al.* Determination of mineral oil-saturated hydrocarbons (MOSH) in vegetable oils by large scale off-line SPE combined with GC-FID. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 94, n. 2, p. 215-223, dez. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11746-016-2936-0>.

LORENZINI, R. *et al.* Saturated and aromatic mineral oil hydrocarbons from paperboard food packaging: estimation of long-term migration from contents in the paperboard and data on boxes from the market. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 27, n. 12, p. 1765-1774, dez. 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2010.517568>.

MACDONALD, R. G.; FRANKLIN, J. N. **The pulp of wood**. New York: MacGraw-Hill, 1969.

MANDER, Lewis N.; WILLIAMS, Craig M. Chromatography with silver nitrate: part 2. **Tetrahedron**, v. 72, n. 9, p. 1133-1150, mar. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2016.01.004>.

MORET, Sabrina *et al.* Optimization of pressurized liquid extraction (PLE) for rapid determination of mineral oil saturated (MOSH) and aromatic hydrocarbons (MOAH) in cardboard and paper intended for food contact. **Talanta**, v. 115, p.

246-252, out. 2013. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2013.04.061>.

MORET, Sabrina *et al.* Rapid and sensitive solid phase extraction-large volume injection-gas chromatography for the analysis of mineral oil saturated and aromatic hydrocarbons in cardboard and dried foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1243, p. 1-5, jun. 2012. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.04.040>.

MORET, Sabrina; GROB, Konrad; CONTE, L. S. On-line high-performance liquid chromatography-solvent evaporation - high-performance liquid chromatography - capillary gas chromatography - flame ionisation detection for the analysis of mineral oil polyaromatic hydrocarbons in fatty foods. **Journal of Chromatography A**, v. 750, n. 1-2, p. 361-368, out. 1996. Disponível em:

[http://dx.doi.org/10.1016/0021-9673\(96\)00453-0](http://dx.doi.org/10.1016/0021-9673(96)00453-0).

MOURAD, Ana L.; GARCIA, Assis E.; BORDIN, Maurício R.; ARDITO, Elisabeth de Fátima G. **Embalagens de papel, cartão e papelão ondulado**. Campinas: CETEA/ITAL, 1999.

NAVARRO, R. M. S; NAVARRO, F. M. S; TAMBOURGI, E. B. Estudo de diferentes processos de obtenção da pasta celulósica para fabricação de papel. **Revista Ciências & Tecnologia**, Campinas, v. 1, n. 1, p. 1-5, dez. 2007.

NEUKOM, Hans-Peter *et al.* Food contamination by C20–C50 mineral paraffins from the atmosphere. **Atmospheric Environment**, v. 36, n. 30, p. 4839-4847, out. 2002. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s1352-2310\(02\)00358-8](http://dx.doi.org/10.1016/s1352-2310(02)00358-8).

NIKITIN, N. I. **The chemistry of cellulose and wood**. Jerusalen: Israel Program, 1966.

NOLETTO, A. P. R. *et al.* **Embalagens de papelão ondulado**: propriedades e avaliação da qualidade. Campinas: Ital/Cetea, 2010. 187 p.

PURCARO, Giorgia; BARP, Laura; MORET, Sabrina. Determination of hydrocarbon contamination in foods. A review. **Analytical Methods**, v. 8, n. 29, p. 5755-5772, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1039/c6ay00655h>.

ROBERT, N. T. F. **Produção de embalagem de papel**. Rio de Janeiro: Rede de Tecnologia e Inovação do Rio de Janeiro - REDETEC, 2012. Disponível em: <http://respostatecnica.org.br/dossie-tecnico/downloadsDT/MjAw>.

SANTOS, C. P.; REIS, I. N.; MOREIRA, J. E. B.; KOSIMA, K. O.; BRASILEIRO, L. B. “Papel: como se fabrica?”. **Química Nova na Escola**, nº 14, Nov. 2001.

SCOTTER, M. J. *et al.* A study of the toxicity of five mineral hydrocarbon waxes and oils in the F344 rat, with histological examination and tissue-specific chemical characterisation of accumulated hydrocarbon material. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, n. 4, p. 489-521, abr. 2003. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0278-6915\(02\)00279-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0278-6915(02)00279-x).

SKOOG, D. A. *et al.* **Fundamentos de química analítica**. São Paulo: Cengage Learning, 2011. 1124 p.

TARNOW, Patrick *et al.* Estrogenic activity of mineral oil aromatic hydrocarbons used in printing inks. **Plos One**, v. 11, n. 1, p. 1-15, jan. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0147239>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Evaluation of certain food additives**: fifty-ninth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Geneva: FAO/WHO, 2002. p. 11-20. (WHO Technical Report Series; 913). Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_913.pdf. Acesso em: 09 maio 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Joint FAO Expert Committee on Food Additives (JECFA). *In*: MEETING, 76., 2012, Geneva. **Summary** [...]. Rome: FAO/WHO, 2012. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-at871e.pdf>.

10. Anexos

Anexo 1

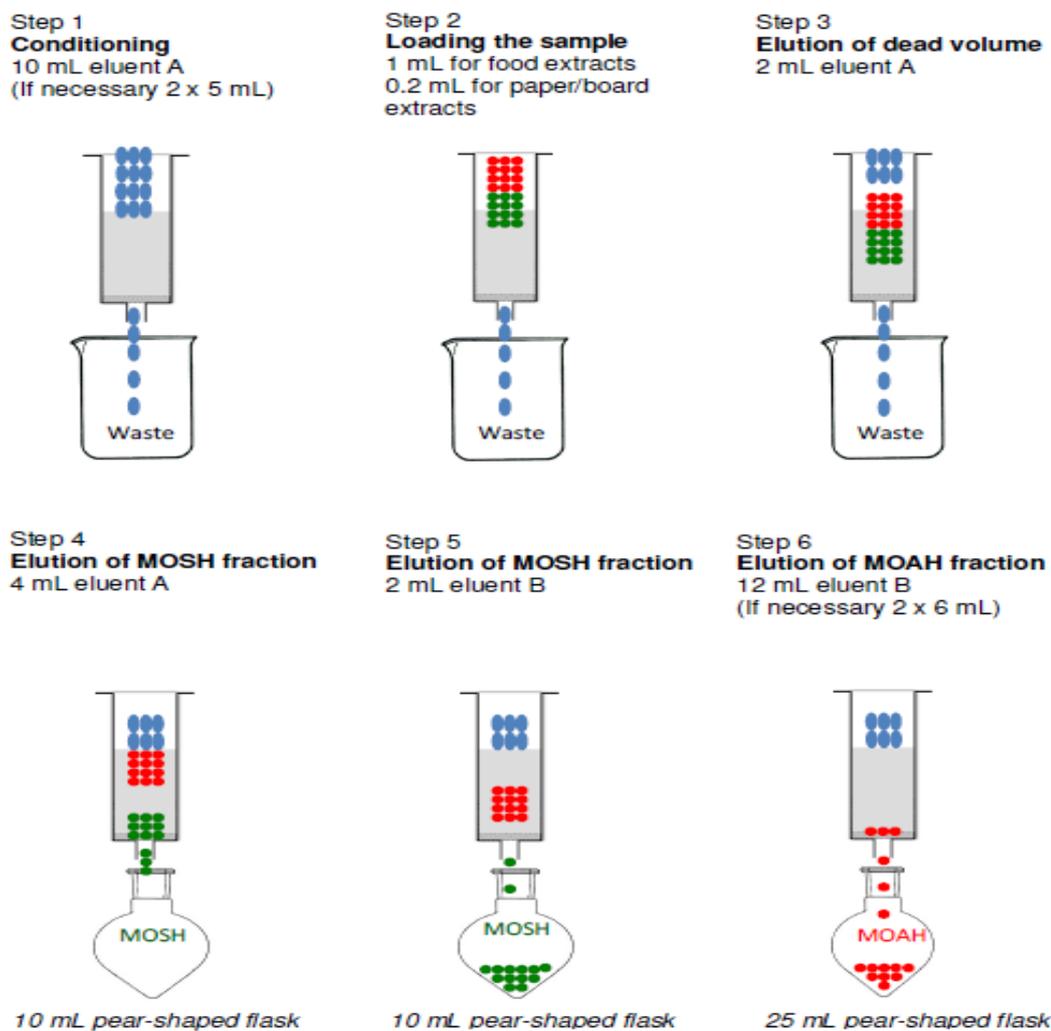


Figura I. Esquema do procedimento de SPE, retirado do método BfR, 2012.

Anexo 2

Resultados do Ensaio Interlaboratorial (DRRR) Amostra 1

Tabela I – Performance do método para a Amostra 1 - MOSH (C16-C25).

Nº do Lab	A1 (mg/kg)	A2 (mg/kg)	A3 (mg/kg)	Média Replicatas (mg/kg)	z'- score (DRRR)	Performance do Lab (DRRR)
1	285,1	283,0	N	284,1	0,12	Satisfatória
2	410,7	337,1	N	373,9	1,51	Satisfatória
3	324,1	278,2	N	301,2	0,39	Satisfatória
4	149,2	143,2	N	146,2	-2,00	Satisfatória
5	316,5	315,8	N	316,2	0,62	Satisfatória
6	405,0	360,0	N	382,5	1,64	Satisfatória
7	278,9	276,2	N	277,6	0,02	Satisfatória
8	252,7	275,3	N	264,0	-0,19	Satisfatória
9	320,8	328,6	N	324,7	0,75	Satisfatória
10	286,0	299,0	N	292,5	0,25	Satisfatória
11	234,7	N	N	234,7	-0,64	Satisfatória
12	198,4	189,7	N	194,1	-1,26	Satisfatória
14	294,5	297,1	N	295,8	0,30	Satisfatória
15	252,0	224,5	N	238,3	-0,58	Satisfatória
16	272,6	272,8	N	272,7	-0,05	Satisfatória
17	180,0	161,2	N	170,6	-1,62	Satisfatória
18	300,8	294,2	N	297,5	0,33	Satisfatória
19	137,5	134,9	N	136,2	-2,15	Questionável
20	183,7	203,9	N	193,8	-1,27	Satisfatória
21	306,5	294,6	N	300,6	0,38	Satisfatória
22	256,8	258,8	N	257,8	-0,28	Satisfatória
23	323,0	386,0	N	354,5	1,21	Satisfatória
24	317,5	225,9	N	271,7	-0,07	Satisfatória
25	289,2	259,9	N	274,6	-0,02	Satisfatória
26	324,5	330,5	N	327,5	0,79	Satisfatória
27*	227,9	206,1	N	217,0	-0,91	Satisfatória

*Resultados do Laboratório nº 27 correspondem aos do presente trabalho.

Tabela II – Performance do método para a Amostra 1 - MOSH (C25-C35).

Nº do Lab	A1 (mg/kg)	A2 (mg/kg)	A3 (mg/kg)	Média Replicatas (mg/kg)	z'- score (DRRR)	Performance do Lab (DRRR)
1	232,7	230,6	N	231,7	0,47	Satisfatória
2	352,6	266,9	N	309,8	1,58	Satisfatória
3	256,0	216,0	N	236,0	0,53	Satisfatória
4	127,1	124,9	N	126,0	-1,05	Satisfatória
5	248,4	245,3	N	246,9	0,68	Satisfatória
6	356,0	328,0	N	342,0	2,05	Questionável
7	222,4	222,3	N	222,4	0,33	Satisfatória
8	212,9	236,3	N	224,6	0,37	Satisfatória
9	313,8	331,1	N	322,5	1,77	Satisfatória
10	235,0	273,0	N	254,0	0,79	Satisfatória
11	157,1	N	N	157,1	-0,60	Satisfatória
12	162,3	167,1	N	164,7	-0,49	Satisfatória
14	251,0	252,7	N	251,9	0,76	Satisfatória
15	156,0	137,8	N	146,9	-0,75	Satisfatória
16	207,8	208,8	N	208,3	0,13	Satisfatória
17	136,2	121,6	N	128,9	-1,00	Satisfatória
18	214,0	210,7	N	212,4	0,19	Satisfatória
19	96,0	106,4	N	101,2	-1,40	Satisfatória
20	128,6	135,9	N	132,3	-0,96	Satisfatória
21	111,0	105,1	N	108,1	-1,30	Satisfatória
22	181,6	180,5	N	181,1	-0,26	Satisfatória
23	112,0	108,0	N	110,0	-1,27	Satisfatória
24	236,7	130,0	N	183,4	-0,22	Satisfatória
25	223,5	212,6	N	218,1	0,27	Satisfatória
26	254,5	257,4	N	256,0	0,81	Satisfatória
27*	105,7	94,8	N	100,3	-1,41	Satisfatória

*Resultados do Laboratório nº 27 correspondem aos do presente trabalho.

Tabela III – Performance do método para a Amostra 1 - MOAH (C16-C25).

Nº do Lab	A1 (mg/kg)	A2 (mg/kg)	A3 (mg/kg)	Média Replicatas (mg/kg)	z'- score (DRRR)	Performance do Lab (DRRR)
1	77,5	76,1	N	76,8	0,24	Satisfatória
2	128,5	116,4	N	122,5	1,97	Satisfatória
3	89,7	73,3	N	81,5	0,42	Satisfatória
4	14,0	13,4	N	13,7	-2,16	Questionável
5	92,4	103,2	N	97,8	1,04	Satisfatória
6	103,0	77,0	N	90,0	0,74	Satisfatória
7	81,0	80,3	N	80,7	0,38	Satisfatória
8	72,4	76,5	N	74,5	0,15	Satisfatória
9	54,1	52,5	N	53,3	-0,65	Satisfatória
10	41,0	35,0	N	38,0	-1,24	Satisfatória
11	46,2	N	N	46,2	-0,92	Satisfatória
12	57,9	55,7	N	56,8	-0,52	Satisfatória
14	83,9	84,9	N	84,4	0,53	Satisfatória
15	85,6	80,7	N	83,2	0,48	Satisfatória
16	75,8	77,1	N	76,5	0,22	Satisfatória
17	58,2	52,4	N	55,3	-0,58	Satisfatória
18	65,4	64,2	N	64,8	-0,22	Satisfatória
19	49,5	53,8	N	51,7	-0,72	Satisfatória
20	49,3	54,1	N	51,7	-0,72	Satisfatória
21	107,3	97,5	N	102,4	1,21	Satisfatória
22	72,2	72,1	N	72,2	0,06	Satisfatória
23	58,0	76,0	N	67,0	-0,13	Satisfatória
24	14,2	11,5	N	12,9	-2,19	Questionável
25	85,8	71,5	N	78,7	0,31	Satisfatória
26	90,4	91,5	N	91,0	0,78	Satisfatória
27*	109,9	108,8	N	109,3	1,53	Satisfatória

*Resultados do Laboratório nº 27 correspondem aos do presente trabalho.

Tabela IV – Performance do método para a Amostra 1 – MOAH (C25-C35).

Nº do Lab	A1 (mg/kg)	A2 (mg/kg)	A3 (mg/kg)	Média Replicatas (mg/kg)	z'- score (DRRR)	Performance do Lab (DRRR)
1	40,6	41,0	N	40,8	0,07	Satisfatória
2	88,5	68,9	N	78,7	4,05	Não Satisfatória
3	50,5	40,2	N	45,4	0,54	Satisfatória
4	2,7	2,3	N	2,5	-3,96	Não Satisfatória
5	37,6	37,2	N	37,4	-0,29	Satisfatória
6	91,0	99,0	N	95,0	5,76	Não Satisfatória
7	47,9	51,9	N	49,9	1,02	Satisfatória
8	33,6	36,9	N	35,3	-0,52	Satisfatória
9	136,6	133,7	N	135,2	9,98	Não Satisfatória
10	34,0	37,0	N	35,5	-0,49	Satisfatória
11	25,9	N	N	25,9	-1,50	Satisfatória
12	31,1	31,1	N	31,1	-0,95	Satisfatória
14	53,4	55,3	N	54,4	1,49	Satisfatória
15	49,0	48,7	N	48,9	0,91	Satisfatória
16	42,1	43,2	N	42,7	0,26	Satisfatória
17	22,9	22,4	N	22,7	-1,84	Satisfatória
18	43,6	40,8	N	42,2	0,21	Satisfatória
19	36,7	24,9	N	30,8	-0,99	Satisfatória
20	42,3	43,7	N	43,0	0,30	Satisfatória
21	42,5	40,2	N	41,4	0,12	Satisfatória
22	32,5	29,5	N	31,0	-0,96	Satisfatória
24	4,9	1,3	N	3,1	-3,90	Não Satisfatória
25	56,7	49,3	N	53,0	1,35	Satisfatória
26	52,0	52,6	N	52,3	1,27	Satisfatória
27*	12,8	11,1	N	12,0	-2,97	Questionável

*Resultados do Laboratório nº 27 correspondem aos do presente trabalho.

Anexo 3

Resultados do Ensaio Interlaboratorial (DRRR) Amostra 2:

Tabela V – Performance do método para a Amostra 2 - MOSH (C16-C25).

Nº do Lab	A1 (mg/kg)	A2 (mg/kg)	A3 (mg/kg)	Média Replicatas (mg/kg)	z'- score (DRRR)	Performance do Lab (DRRR)
1	24,2	24,1	N	24,2	0,01	Satisfatória
2	41,0	30,3	N	35,7	1,45	Satisfatória
3	24,3	21,2	N	22,8	-0,17	Satisfatória
4	65,3	68,8	N	67,1	5,39	Não Satisfatória
5	25,0	25,4	N	25,2	0,14	Satisfatória
6	52,0	36,0	N	44,0	2,50	Questionável
7	23,9	24,1	N	24,0	-0,01	Satisfatória
8	26,2	26,1	N	26,2	0,26	Satisfatória
9	29,9	27,0	N	28,5	0,55	Satisfatória
11	19,5	N	N	19,5	-0,57	Satisfatória
12	16,7	16,0	N	16,4	-0,97	Satisfatória
14	25,1	24,3	N	24,7	0,08	Satisfatória
15	26,4	28,1	N	27,3	0,40	Satisfatória
16	21,7	20,6	N	21,2	-0,37	Satisfatória
17	6,8	7,8	N	7,3	-2,10	Questionável
18	27,4	27,1	N	27,3	0,40	Satisfatória
19	60,3	57,8	N	59,1	4,38	Não Satisfatória
20	16,9	16,0	N	16,5	-0,96	Satisfatória
21	28,2	27,2	N	27,7	0,45	Satisfatória
22	16,9	16,3	N	16,6	-0,94	Satisfatória
24	7,4	10,2	N	8,8	-1,91	Satisfatória
25	24,4	22,4	N	23,4	-0,08	Satisfatória
26	28,2	28,2	N	28,2	0,52	Satisfatória
27*	24,1	25,5	N	24,8	0,05	Satisfatória

*Resultados do Laboratório nº 27 correspondem aos do presente trabalho.

Tabela VI – Performance do método para a Amostra 2 - MOSH (C25-C35).

Nº do Lab	A1 (mg/kg)	A2 (mg/kg)	A3 (mg/kg)	Média Replicatas (mg/kg)	z'- score (DRRR)	Performance do Lab (DRRR)
1	3,4	3,6	N	3,5	-0,77	Satisfatória
2	7,0	8,2	N	7,6	0,77	Satisfatória
3	5,3	3,8	N	4,6	-0,38	Satisfatória
4	30,0	31,4	N	30,7	9,49	Não Satisfatória
6	10,0	9,0	N	9,5	1,49	Satisfatória
8	4,4	5,2	N	4,8	-0,28	Satisfatória
9	7,5	4,2	N	5,9	0,11	Satisfatória
11	11,3	N	N	11,3	2,17	Questionável
12	3,3	2,4	N	2,9	-1,02	Satisfatória
14	9,3	10,1	N	9,7	1,57	Satisfatória
15	4,9	5,2	N	5,1	-0,19	Satisfatória
16	3,5	1,8	N	2,7	-1,09	Satisfatória
18	6,9	4,9	N	5,9	0,13	Satisfatória
19	68,7	85,6	N	77,2	27,02	Não Satisfatória
20	4,9	4,6	N	4,8	-0,30	Satisfatória
21	6,8	6,4	N	6,6	0,40	Satisfatória
22	1,3	2,3	N	1,8	-1,42	Satisfatória
25	8,1	8,7	N	8,4	1,08	Satisfatória
26	5,2	5,3	N	5,3	-0,11	Satisfatória
27*	5,2	5,1	N	5,1	-0,16	Satisfatória

*Resultados do Laboratório nº 27 correspondem aos do presente trabalho.

Tabela VII – Performance do método para a Amostra 2 - MOAH (C16-C25).

Nº do Lab	A1 (mg/kg)	A2 (mg/kg)	A3 (mg/kg)	Média Replicatas (mg/kg)	z'- score (DRRR)	Performance do Lab (DRRR)
1	18,8	18,9	N	18,9	0,03	Satisfatória
2	32,3	23,7	N	28,0	1,19	Satisfatória
3	22,8	20,4	N	21,6	0,38	Satisfatória
4	5,4	6,3	N	5,9	-1,61	Satisfatória
5	44,8	43,4	N	44,1	3,22	Não Satisfatória
6	31,0	29,0	N	30,0	1,44	Satisfatória
7	23,6	23,2	N	23,4	0,61	Satisfatória
8	17,3	18,2	N	17,8	-0,11	Satisfatória
9	20,2	19,4	N	19,8	0,15	Satisfatória
11	2,8	N	N	2,8	-2,00	Questionável
12	12,6	12,5	N	12,6	-0,76	Satisfatória
14	21,8	21,7	N	21,8	0,40	Satisfatória
15	23,0	23,0	N	23,0	0,56	Satisfatória
16	18,3	18,8	N	18,6	-0,01	Satisfatória
18	7,0	5,5	N	6,3	-1,56	Satisfatória
19	48,1	47,0	N	47,6	3,66	Não Satisfatória
20	8,3	7,6	N	8,0	-1,35	Satisfatória
21	22,6	22,9	N	22,8	0,52	Satisfatória
22	10,8	9,4	N	10,1	-1,07	Satisfatória
24	6,5	4,2	N	5,4	-1,67	Satisfatória
25	19,3	17,9	N	18,6	0,00	Satisfatória
26	23,6	24,1	N	23,9	0,66	Satisfatória
27*	12,0	30,3	N	21,1	0,29	Satisfatória

*Resultados do Laboratório nº 27 correspondem aos do presente trabalho.

Tabela VIII – Performance do método para a Amostra 2 - MOAH (C25-C35).

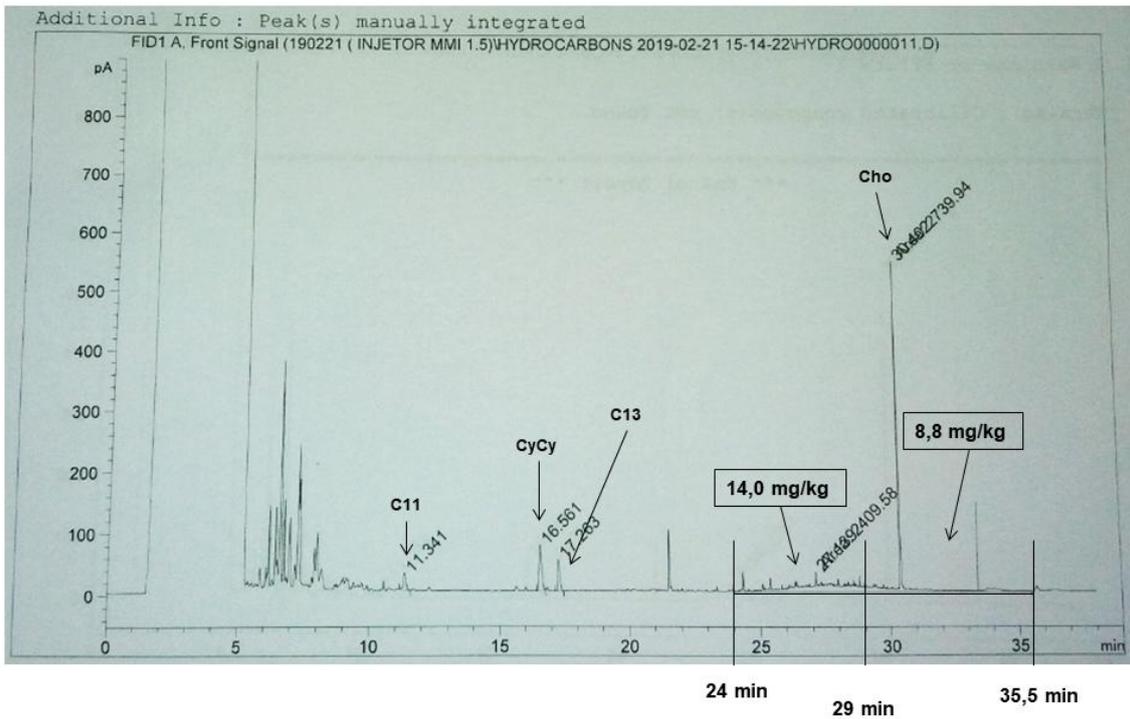
Nº do Lab	A1 (mg/kg)	A2 (mg/kg)	A3 (mg/kg)	Média Replicatas (mg/kg)	z'- score (DRRR)	Performance do Lab (DRRR)
1	1,7	1,8	N	1,8	-0,76	Satisfatória
2	6,4	9,3	N	7,9	0,85	Satisfatória
3	2,7	2,9	N	2,8	-0,48	Satisfatória
4	1,5	1,4	N	1,5	-0,84	Satisfatória
5	4,0	5,6	N	4,8	0,04	Satisfatória
6	16,0	10,0	N	13,0	2,20	Questionável
7	2,8	3,0	N	2,9	-0,46	Satisfatória
8	2,2	3,2	N	2,7	-0,51	Satisfatória
9	26,3	27,2	N	26,8	5,81	Não Satisfatória
11	0,5	N	N	0,5	-1,09	Satisfatória
14	8,7	8,4	N	8,6	1,03	Satisfatória
15	2,4	2,3	N	2,4	-0,60	Satisfatória
18	6,3	4,7	N	5,5	0,23	Satisfatória
19	72,5	84,5	N	78,5	19,41	Não Satisfatória
20	2,4	1,2	N	1,8	-0,74	Satisfatória
21	11,4	10,2	N	10,8	1,62	Questionável
22	0,5	0,5	N	0,5	-1,09	Satisfatória
25	6,5	7,3	N	6,9	0,60	Satisfatória
27*	$\leq 5,7^{(1)}$	$\leq 5,7^{(1)}$	N	$\leq 5,7^{(1)}$	-1,28	Satisfatória

*Resultados do Laboratório nº 27 correspondem aos do presente trabalho.

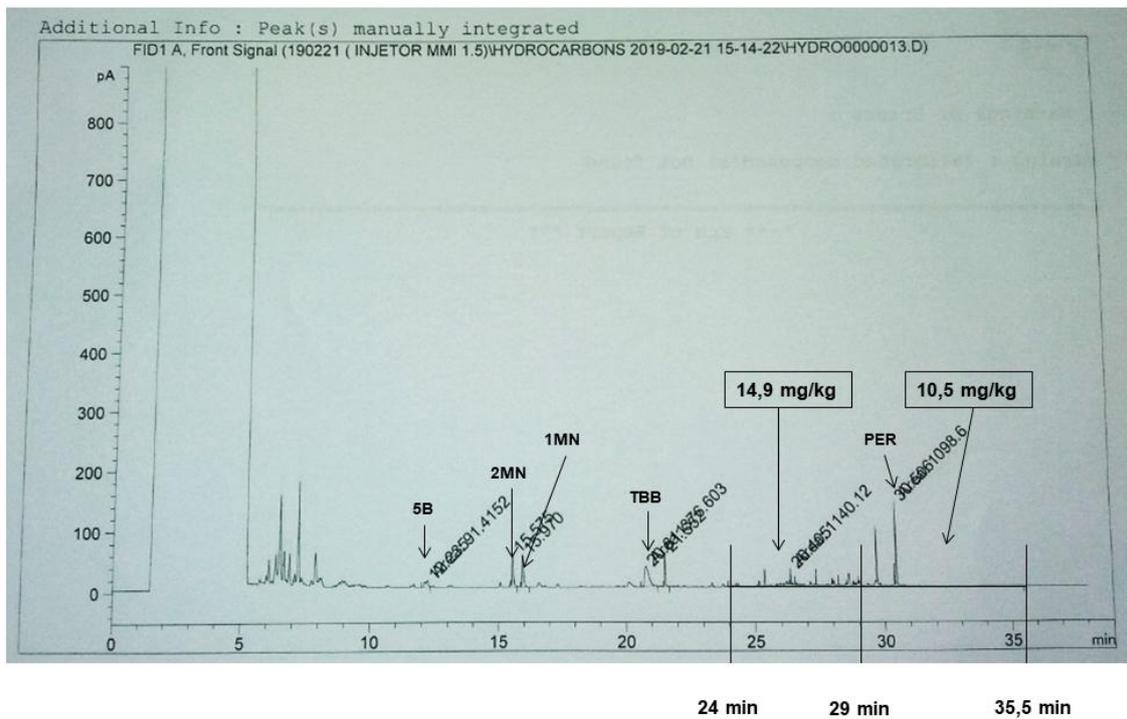
(1). Limite de quantificação do método. Valor utilizado para o cálculo do z score.

Anexo 4

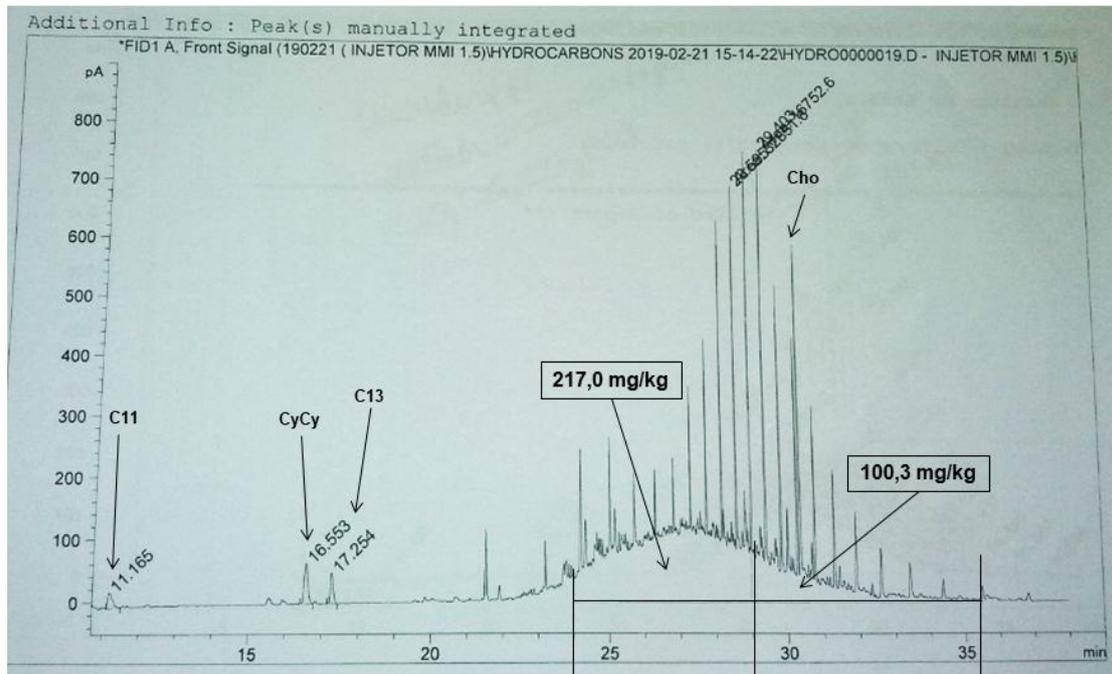
Principais Cromatogramas da Amostra 1 da Análise Interlaboratorial:



Amostra 1: Cromatograma do Branco MOSH (1ª injeção)

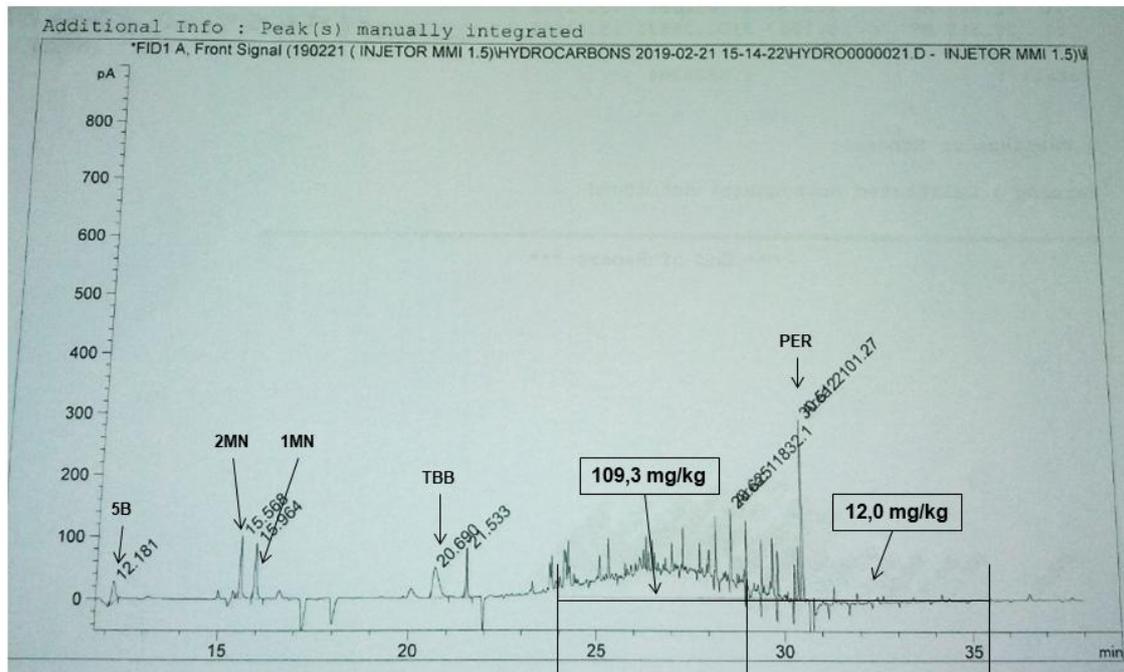


Amostra 1: Cromatograma do Branco MOAH (1ª injeção)



24 min 29 min 35,5 min

Amostra 1: Cromatograma MOSH

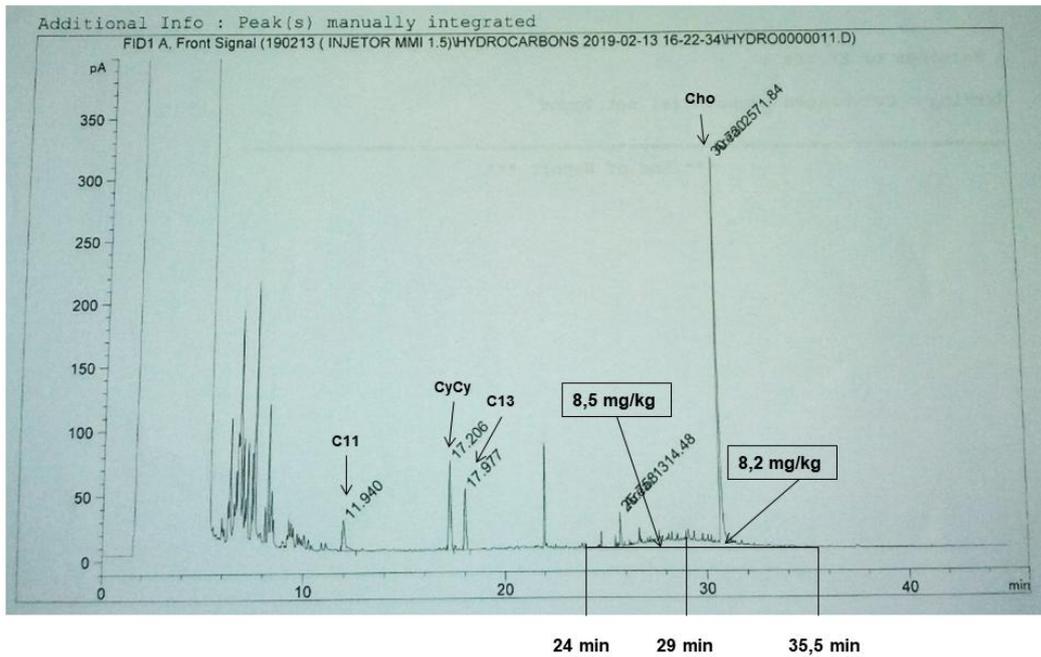


24 min 29 min 35,5 min

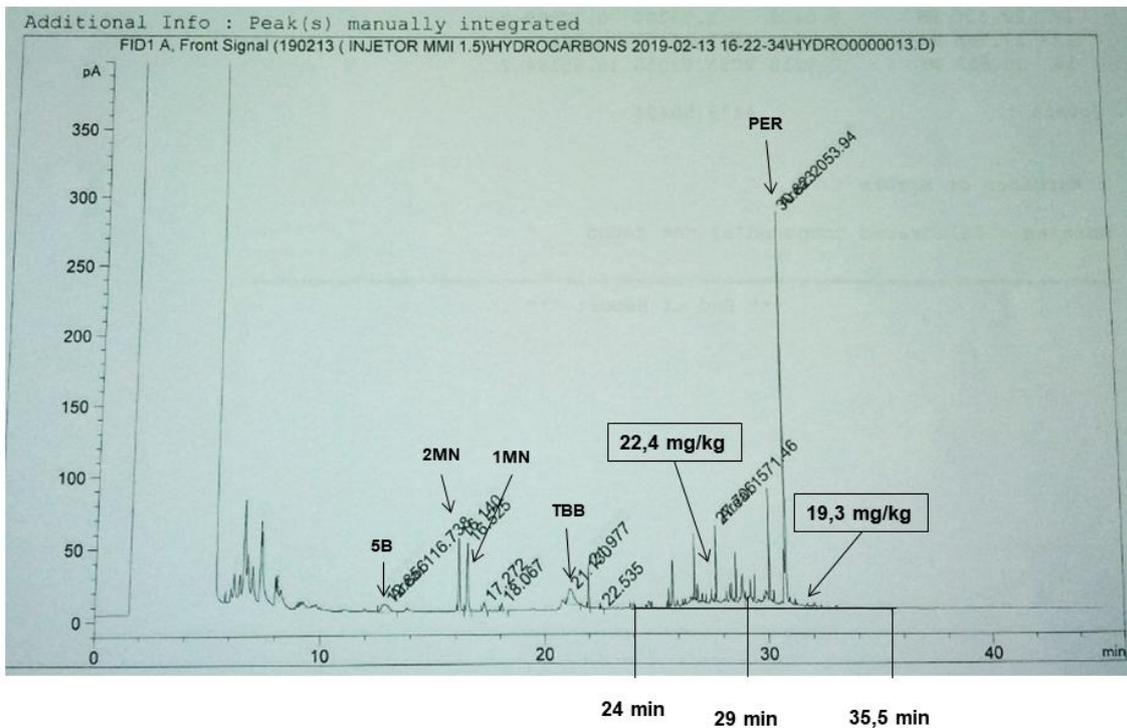
Amostra 1: Cromatograma MOAH

Anexo 5

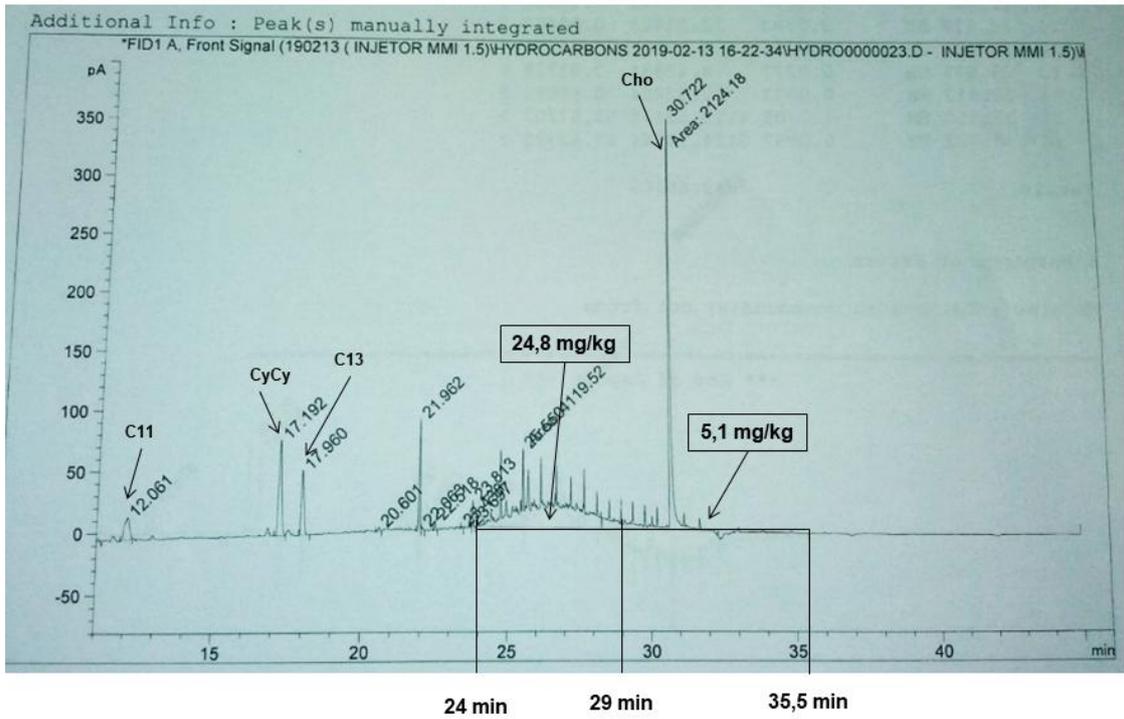
Principais Cromatogramas da Amostra 2 da Análise Interlaboratorial.



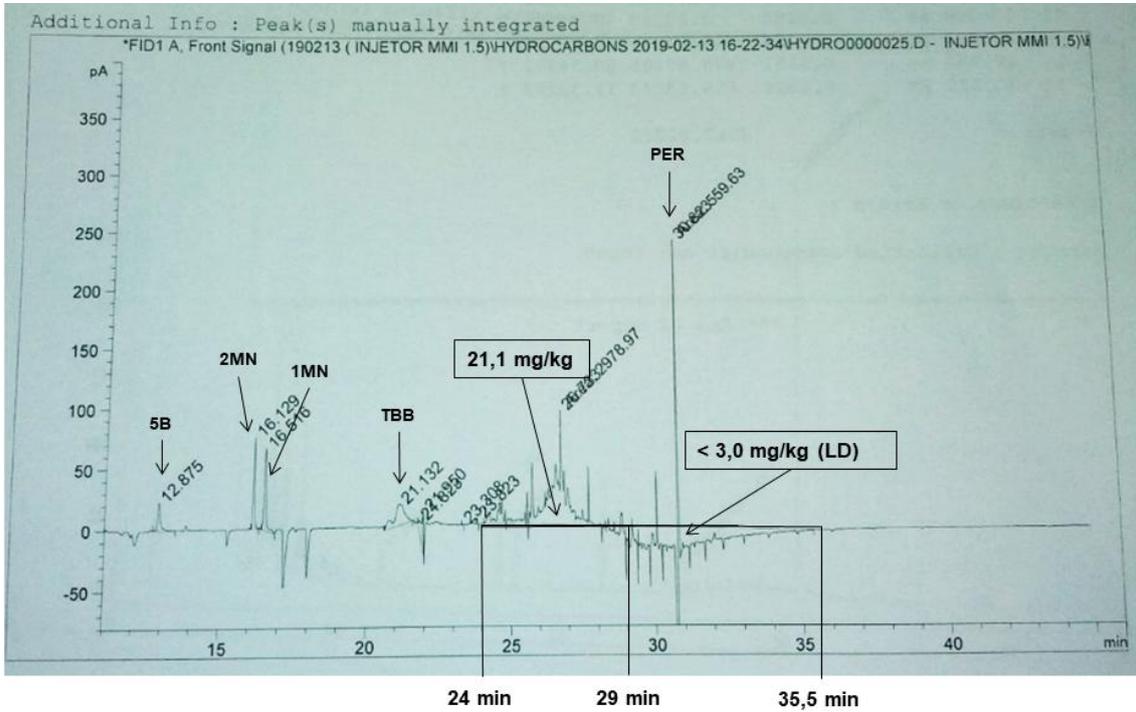
Amostra 2: Cromatograma do Branco MOSH (1ª injeção)



Amostra 2: Cromatograma do Branco MOAH (1ª injeção)



Amostra 2: Cromatograma MOSH



Amostra 2: Cromatograma MOAH