

Uso do MASP (Método de Análise e Solução de Problemas) para possibilitar a reprodução de método de cromatografia líquida

Kaliane Regalin Aver^a

Centro de Ciências Exatas e Tecnologias, Universidade de Caxias do Sul, Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130, Caxias do Sul, Brasil.

^akalianeregalin@gmail.com

Fecha recepción: mayo 27 de 2022

Fecha aceptación: diciembre 26 de 2022

Resumo

O objetivo desse trabalho é utilizar o MASP (método de análise e solução de problemas) para possibilitar o desenvolvimento e/ou a reprodução de método cromatográfico para análise de sorbitol em suco de uva integral, permitindo assim a identificação de fraudes e adulterações nessa bebida. Embora estejam disponíveis no estudo da arte diferentes métodos cromatográficos para essa análise, a eficiência, seletividade e robustez de um método cromatográfico estão diretamente ligadas às condições disponíveis em cada laboratório. Dessa forma, a repetição dos parâmetros previamente determinados na literatura não é garantia de bons resultados. Durante a reprodução do método analítico de sorbitol, identificou-se a presença de um interferente e a baixa resolução do analito em decorrência da sua presença. Dessa forma, apresentou-se o MASP como método para identificação e posterior resolução da problemática encontrada. A metodologia permitiu o levantamento de possíveis causas raiz, sendo elaborados e praticados diferentes planos de ação, cada qual fornecendo resultados responsáveis por eliminar determinada causa, colaborar com a maior compreensão do problema em si e, finalmente detectar a causa raiz. Com a causa determinada, foi possível reposicionar os módulos do equipamento do HPLC, reduzindo o comprimento do capilar entre a saída da coluna de separação e a entrada do detector RID. Dessa forma, o MASP foi um método prático e eficiente na identificação e solução do problema, permitindo o desenvolvimento de um método seletivo e robusto para a análise de sorbitol por HPLC em sucos de uva integral.

Palavras-chave: MASP; Cromatografia; Qualidade; CLAE; Sorbitol.

Cita: Regalin Aver K. Uso do MASP (Método de Análise e Solução de Problemas) para possibilitar a reprodução de método de cromatografia líquida. rev. ion. 2023;36(1):15-28. doi:[10.18273/revion.v36n1-2023002](https://doi.org/10.18273/revion.v36n1-2023002)

Uso de MASP (método de análisis y resolución de problemas) para permitir la reproducción del método de cromatografía líquida

Resumen

El objetivo de este trabajo es utilizar el MASP (método de análisis y resolución de problemas) para posibilitar el desarrollo y/o reproducción de un método cromatográfico para el análisis de sorbitol en jugo de uva entero, que permita identificar fraudes y adulteraciones en esta bebida. Aunque hay diferentes métodos cromatográficos disponibles en el estudio de la técnica para este análisis, la eficiencia, la selectividad y la solidez de un método cromatográfico están directamente relacionadas con las condiciones disponibles en cada laboratorio. Así, la repetición de parámetros previamente determinados en la literatura no es garantía de buenos resultados. Durante la reproducción del método analítico de sorbitol se identificó la presencia de un interferente y la baja resolución del analito debido a su presencia. De esta forma, el MASP se presentó como un método para la identificación y posterior solución del problema encontrado. La metodología permitió el relevamiento de las posibles causas raíces, elaborando y practicando diferentes planes de acción, cada uno de los cuales arroja resultados responsables de eliminar una determinada causa, colaborando con una mayor comprensión del problema en sí y, finalmente, detectando la causa raíz. Determinada la causa, se logró reposicionar los módulos del equipo HPLC, reduciendo la longitud del capilar entre la salida de la columna de separación y la entrada del detector RID. Así, el MASP resultó un método práctico y eficiente para identificar y resolver el problema, permitiendo el desarrollo de un método selectivo y robusto para el análisis de sorbitol por HPLC en jugos de uva entera.

Palabras clave: MASP; Cromatografía; Calidad; CLAE; Sorbitol.

Use of MASP (Analysis and Problem Solving Method) to enable the reproduction of the liquid chromatography method

Abstract

The aim of this work is to use MASP (analysis and problem solving method) to develop and/or reproduce a chromatographic method for the analysis of sorbitol in whole grape juice, making possible the identification of frauds and adulterations in this beverage. Although different chromatographic methods for this analysis are available in the literature, the efficiency, selectivity and robustness of a chromatographic method are directly related to the conditions available in each laboratory. Therefore, the repetition of parameters previously determined in the literature does not ensure good results. During the reproduction of the sorbitol analytical method, an interference has been identified as the cause of the low resolution of the analyte peak. In such wise, the MASP was presented as a method for identifying and solving a problem. Owing to the methodology, it was possible list the possible root causes, elaborate and practice different action plans, eliminate certain causes based on action plans results, improving the understanding about the problem and, finally, detecting the root cause. With the cause determined, it was possible to reposition the modules of the HPLC equipment, reducing the length of the capillary between the outlet of the separation column and the inlet of the RID detector. Thus, the MASP was a practical and efficient method to identify and solve the problem, allowing the development of a selective and robust method for the analysis of sorbitol by HPLC in whole grape juices.

Keywords: MASP; Chromatography; Quality; HPLC; Sorbitol.

Introdução

Métodos cromatográficos cuja confiabilidade seja assegurada são essenciais para a detecção de adulterações no ramo de alimentos e, conseqüentemente, para a segurança dos consumidores. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) vem sendo utilizada como uma técnica analítica de detecção de diferentes fraudes em produtos tais como sucos, leite e derivados, café, chás, vinhos, mel e bebidas destiladas [1-5]. No caso do suco de uva, a legislação brasileira o define como sendo a bebida não fermentada, obtida do mosto simples, sulfitado ou concentrado, de uva sã, fresca e madura, sendo tolerada graduação alcoólica de até 0,5° G.L. Assim, não é permitida a adição de outras substâncias ao suco de uva, tais como água, açúcares ou sucos de outras frutas [6].

Dessa forma, caracteriza-se como adulteração a adição de qualquer outro suco ao suco de uva. A forma mais frequente dessa alteração é através da adição de suco de maçã, seja por questões econômicas ou sensoriais [7]. O suco de maçã possui alguns compostos, tais como a florizina e o sorbitol, que não estão presentes (ou estão presentes em quantidades mínimas) no suco de uva, permitindo assim a detecção da adulteração. Assim, métodos capazes de quantificar estes analitos no suco de uva são imprescindíveis para o controle da qualidade desse produto.

Embora a literatura disponha de diversas publicações à respeito de métodos cromatográficos validados capazes de detectar fraudes e garantir a autenticidade dessa bebida, a reprodução desses métodos pode requerer adaptações em função da complexidade e das diferenças mecânicas observadas entre os equipamentos de CLAE. Isto significa que a reprodução das condições cromatográficas apresentadas na literatura é o primeiro passo para dispor daquele método, mas esta etapa deve ser seguida de uma otimização e validação a fim de garantir a confiabilidade do método original [8-10].

As fontes de interferência em ensaios laboratoriais, as quais podem resultar na não validação do método final, têm origem nas mais diversas atividades executadas durante todo o processo analítico, podendo envolver as condições ambientais, o instrumento analítico, o manuseio dos itens de ensaio, os materiais de referência e reagentes químicos, os recursos humanos, a amostragem e a coleta [11].

O equipamento CLAE é composto por injetor (automático ou manual), bomba (simples, binária ou quaternária), forno, coluna de separação e detector. As dimensões e características técnicas variam conforme a marca e o modelo do equipamento. Até mesmo o comprimento dos capilares entre os diferentes módulos é determinante na reprodutibilidade eficiente do método. Além disso, ainda existem as especificações do método, as quais são as especificações que programam como será o funcionamento de cada um dos módulos recém mencionados. A composição da fase móvel (FM) e da fase estacionária (FE) também são determinantes no processo de separação do analito desejado. Dessa forma, pode-se identificar o elevado número de variáveis envolvido no desenvolvimento de um método analítico empregando CLAE. Assim, a reprodução de um método cromatográfico já disposto na literatura exige conhecimento e habilidade para efetuar modificações técnicas conforme a necessidade e a melhor resposta de cada parâmetro, uma vez que a simples reprodução das condições cromatográficas não necessariamente resulta em um método com características de linearidade, seletividade, robustez, reprodutibilidade, precisão, exatidão e limites de quantificação e de detecção adequados à situação do laboratório [11,12].

Neste contexto, o MASP (método de análise de solução de problemas) pode se apresentar como uma ferramenta capaz de auxiliar a identificar e a resolver os empecilhos encontrados para a reprodução de um método cromatográfico já descrito na literatura. É uma das metodologias mais utilizadas para solucionar problemas, sendo extremamente simples, prática e de grande amplitude. Baseado no método japonês QC-Sstory, ele faz uso de diferentes ferramentas da qualidade, propiciando a sistematização da solução do problema de forma ordenada e lógica [13].

Desta forma, o objetivo deste trabalho é aplicar o método de MASP para encontrar a causa e solucionar a problemática observada durante a reprodução de um método de análise de sorbitol em suco de uva integral, uma vez que a reprodução do método normalizado em outro equipamento não apresentou a capacidade de separar o analito adequadamente, fazendo com que o método não fosse seletivo nessa situação. A aplicação da metodologia MASP no contexto da cromatografia é uma inovação do ramo.

Metodologia

A reprodução do método normalizado de sorbitol deparou-se com a baixa resolução do pico do analito. Conforme [14], o valor mínimo de resolução que permite a quantificação da área do pico é de 1,00 (Figura 1). Valores abaixo desse podem, inclusive, conter um interferente eluindo no mesmo tempo de retenção do analito, interferindo na seletividade do método, e conseqüentemente, no resultado da análise.

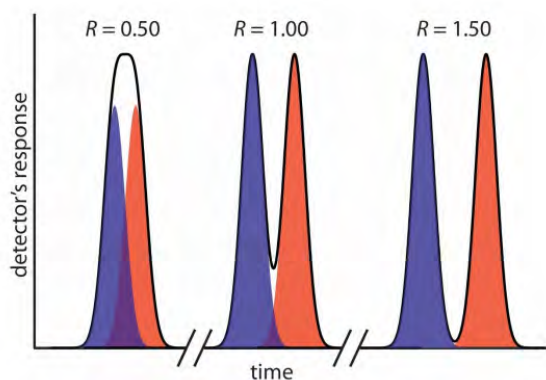


Figura 1. Diferentes resoluções de picos. Fonte [15].

Considerando-se a baixa resolução do pico de sorbitol obtida na tentativa de reprodução do método normalizado, será utilizado o MASP para otimizar o método e proporcionar uma resolução adequada do pico.

Para tanto, serão realizadas as oito etapas do MASP de forma sequencial, sendo elas: [13,16,17].

- 1) Identificação do problema: definir de forma clara o problema e reconhecer a importância de sua solução. A análise de Pareto pode ser empregada para priorizar temas e estabelecer metas;
- 2) Observação: fase em que as características específicas do problema são investigadas sob vários pontos de vista. Os dados são coletados e estratificados, podendo ser representados graficamente;
- 3) Análise: Busca-se descobrir as causas fundamentais do problema. Deve-se buscar envolver as pessoas que exercem as atividades, utilizando a ferramenta brainstorming e o diagrama de causa e efeito;
- 4) Plano de ação: planeja-se uma estratégia de ação com o objetivo de bloquear as causas fundamentais;
- 5) Ação: Bloquear as causas potenciais de

geração do problema conforme definido na etapa anterior;

- 6) Verificação: verificar se o bloqueio realizado na etapa anterior foi efetivo, ou seja, comparar-se os dados coletados antes e após a ação, podendo assim verificar a continuidade ou não do problema. Se o bloqueio não foi efetivo, retorna-se à etapa da observação;
- 7) Padronização: Adotar como padrão as ações eficazes presentes no plano de ação, eliminando a possibilidade de recorrência da causa do problema;
- 8) Conclusão: Avalia-se a aplicação do método utilizado, verificando o que pode ser aperfeiçoado ou replicado em situações futuras.

Resultados e discussão

A primeira etapa do método de MASP é a identificação do problema. Nesse caso, um problema específico foi diretamente observado durante o desenvolver de uma atividade.

A atividade é a reprodução do método de análise de sorbitol em suco de uva a partir da técnica de HPLC. Reprodução pois o método utilizado como referência é um método normalizado, ou seja, já teve parâmetros como seletividade, linearidade, robustez, limite de quantificação e detecção avaliados de forma satisfatório. Tratando-se de cromatografia, a reprodução de métodos consiste em utilizar a mesma coluna de separação (com mesma composição e mesmas dimensões) e a mesma fase móvel, além de equipamentos com os mesmos princípios).

Este método normalizado já estava validado e sendo utilizado em outro laboratório de forma rotineira. O objetivo da reprodução do método, portanto, era unicamente validar esse método em outro equipamento.

A reprodução das variáveis mencionadas, no entanto, resultou em uma análise cujo pico do analito apresentava resolução inferior a 1, indicando que o método não era seletivo e, dessa forma, não poderia ser utilizado para a quantificação do analito. O problema identificado, então, foi a baixa resolução do pico de sorbitol.

A segunda etapa do método de MAPS é a observação, ou seja, a investigação das características específicas do problema a partir de vários pontos de vista, conhecendo-o assim de forma mais aprofundada e facilitando a posterior identificação de suas causas.

Uma observação técnica importante refere-se à primeira injeção de amostra no equipamento CLAE, já que esta tende a não apresentar os resultados estabilizados e, portanto, deve ser desprezada. A resolução do pico, no entanto, não aumenta nas demais injeções.

Também são informações relevantes o fato de um módulo do equipamento e um consumível serem novos, adquiridos justamente para a reprodução deste método. O consumível é a coluna de separação e o módulo é o do detector por índice de refração (RID – *refractive index detector*). Ambos foram adquiridos conforme especificações técnicas. A coluna de separação é idêntica àquela utilizada no método de referência.

Colunas de separação de HPLC devem passar por um processo de adaptação antes de serem utilizadas nas condições dos métodos cromatográficos. Essa etapa é importante para evitar a criação de caminhos preferenciais e, conseqüentemente a redução da capacidade de separação da coluna. Além disso, a coluna usada nesse método, em específico, não pode ser submetida a temperatura de 80 °C sem que haja fluxo interno de fase móvel, sob conseqüência de danificar a fase estacionária e, conseqüentemente, a coluna.

O detector RI (por índice de refração), por sua vez, também é um equipamento que exige instalação e configurações adequadas a cada situação. A configuração correta exige a realização de alguns ensaios práticos a fim de descobrir as condições ideais. Tanto a instalação do RID quando a adaptação da coluna de HPLC foram realizadas por técnico externo especializado na marca do equipamento adquirido.

Após compreender o problema de forma mais aprofundada, a terceira etapa do MASP é a análise, buscando-se assim identificar as causas fundamentais do problema. Utilizou-se um brainstorming para o levantamento das possíveis causas.

O resultado do brainstorming está apresentado na forma de um diagrama de Ishikawa (**Figura 2**), também conhecido como diagrama de “espinha-de-peixe” ou diagrama de causa e efeito. Tal diagrama é uma representação que organiza todas as causas reais ou potenciais do problema observado. Sua construção fundamenta-se no levantamento de dados através de um

brainstorming, por exemplo. É importante ressaltar que esse levantamento deve ser realizado por pessoal devidamente capacitado e familiarizado com o problema avaliado. As causas podem ser agrupadas por similaridade, apresentando-se na forma de causas primárias, secundárias, terciárias, etc.

Apesar de ser uma técnica que permite levantar, analisar e detalhar as causas, ela não prioriza uma causa frente à outra, não determinando qual deve ser tratada primeiramente [17].

A causa “Coluna de separação inadequada” e suas ramificações pode, por razões técnicas, ser rejeitada. A composição exata da fase estacionária de uma coluna de HPLC, a forma de empacotamento, o tamanho e a forma das partículas são fatores que interferem significativamente na análise e são, de certa forma, segredo comercial. Assim, adquirir uma coluna de outro fabricante com especificações técnicas semelhantes já seria um fator a ser considerado no caso de falta de resolução do pico do analito. Todavia, a coluna adquirida tinha exatamente as mesmas especificações, as mesmas dimensões e a mesma marca, declinando a possibilidade de ser esta uma das causas da baixa resolução do pico. Além disso, o relatório de teste da coluna da própria fábrica apresentava todos os parâmetros dentro dos valores pré-estabelecidos, indicado a eficácia e a qualidade da coluna.

A primeira causa a ser investigada foi a que, de acordo com a visão técnica, seria a com maior probabilidade de solucionar o problema, sendo ela a “composição da fase móvel” e suas ramificações. A cromatografia é uma técnica de separação na qual os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases: a fase estacionária e a fase móvel. A interação do analito com essas fases é um dos fatores determinantes na capacidade de separação da coluna e na resolução dos picos. Características da fase móvel tais como polaridade, pH, viscosidade e capacidade de troca, por exemplo, representam alguns dos princípios de separação das colunas e, conseqüentemente, são fundamentais para obter um cromatograma com picos de boa resolução [14]. Dessa forma, modificações na composição da fase móvel poderiam solucionar a baixa resolução apresentada no pico de sorbitol.

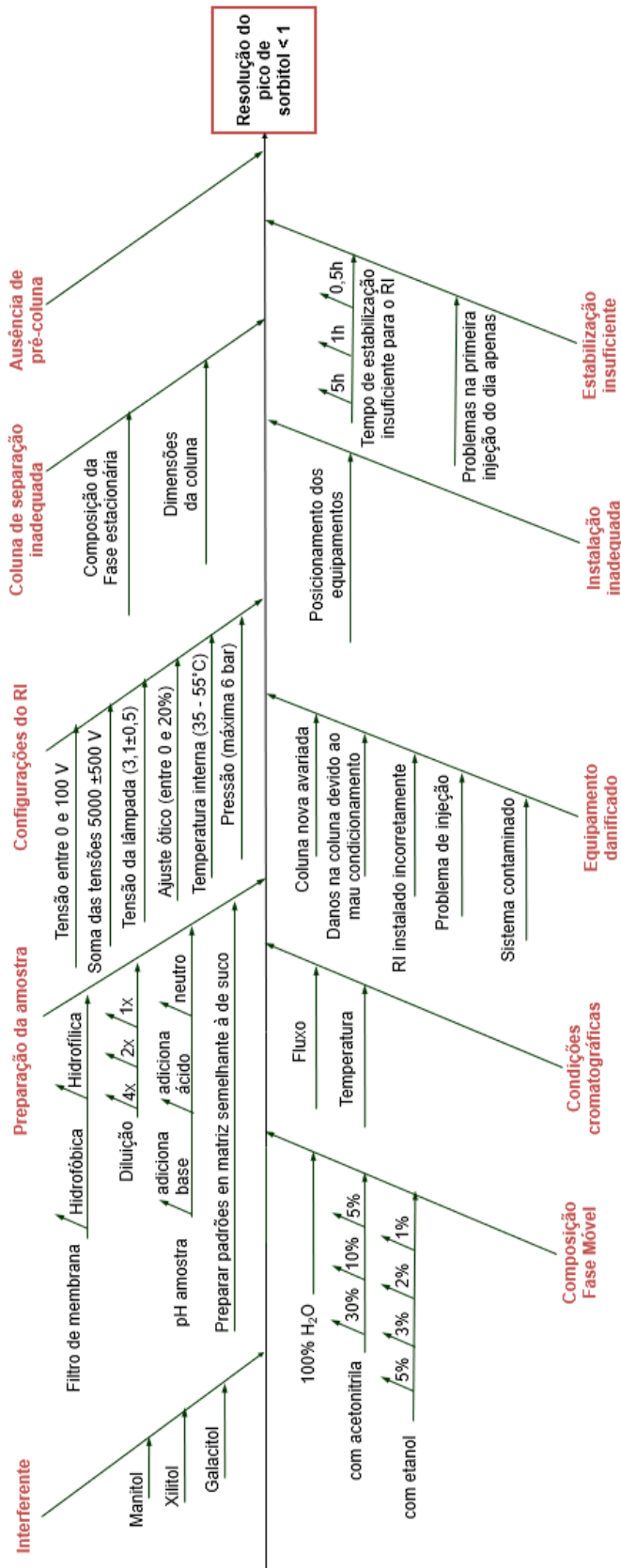


Figura 2. Diagrama de Ishikawa.

A escolha da composição da fase móvel, no entanto está limitada às condições com as quais a fase estacionária da coluna é compatível. Essas informações estão disponíveis no manual da coluna. No método de referência normalizado, a análise foi realizada utilizando água ultra pura como fase móvel. O manual da coluna [18] menciona que, na maioria das situações, empregar apenas água como fase móvel já é suficiente para essa coluna. Menciona, no entanto, alguns modificadores orgânicos que também pode ser empregados a fim de otimizar a eficiência da separação. São 3 os modificadores mencionados, cada um com uma quantidade máxima a ser empregada, conforme [Quadro 1](#).

Quadro 1. Modificadores orgânicos para a coluna HPX 87C.

Modificador orgânico	Concentração máxima (%)
Acetonitrila	30
Etanol	5
Isopropanol	5

Com base nessas informações e sabendo-se da importância da fase móvel nas análises cromatográficas, optou-se por priorizar essa possível causa e construir um plano de ação para avaliar seu impacto no problema da resolução do pico de sorbitol.

O plano de ação (quarta etapa do MASP) definiu que seriam realizados testes com as seguintes composições da fase móvel:

- 1 % etanol
- 2 % de etanol
- 3 % de etanol
- 5 % de etanol
- 5 % de acetonitrila
- 10 % de acetonitrila
- 30 % de acetonitrila

Os modificadores orgânicos foram selecionados com base nas indicações presentes no manual da coluna de separação uma vez que o uso de outros compostos poderia danificar permanentemente o uso da mesma. Os ensaios seriam iniciados pelas concentrações inferiores e somente seriam realizados com as concentrações superiores caso o resultado esperado não fosse atingido.

A organização do plano de ação pode se basear na ferramenta 5W2H, especificando com clareza a resposta para cinco perguntas em inglês: *what* (o quê?), *when* (quando?), *who* (quem?), *where*

(onde), *why* (por quê?), *how* (como?) e *how much* (quanto custa?).

A quinta etapa do MASP é a ação. Assim, o plano de ação foi realizado conforme sua elaboração. Foram realizados todos os ensaios previstos em todas as concentrações mencionadas. Os diferentes ensaios foram realizados considerando o tempo necessário de estabilização para cada nova condição.

Durante a sexta etapa, a verificação, as ações elaboradas no 5W2H e os resultados oriundos da execução são comparados com as metas que foram anteriormente estabelecidas. É durante essa fase que se busca responder se o bloqueio das causas raízes do problema foi efetivo.

As concentrações de acetonitrila de 30 % e de etanol de 3 % apresentaram melhora na resolução do pico de sorbitol. Todavia, isso não foi suficiente para solucionar o problema.

Paralelo à melhora na separação dos picos, ocorreu uma ondulação na linha de base. As concentrações maiores de modificadores orgânicos resultaram em uma melhor separação dos picos, todavia, também resultaram em uma maior ondulação da linha de base. Essa ondulação é prejudicial pois aumenta significativamente o ruído, interferindo no limite de quantificação do método de forma significativa.

Dessa forma, o bloqueio não foi efetivo e, segundo o método MASP, deve-se retornar a etapa de observação. Agora, além das demais possíveis causas mencionadas no diagrama de Ishikawa para as quais não propomos nenhum plano de ação, também temos como dados as informações obtidas com esses ensaios de composição da fase móvel.

Uma das informações provenientes desses ensaios foi a coeluição de outras substâncias junto com o analito. Além dos dois picos que estavam com baixa resolução, foi detectado um terceiro pico, o qual estava coeluinto com o analito e, dessa forma, interferindo diretamente na seletividade do método.

Essa possibilidade havia sido considerada no diagrama de causa e efeito e, considerando a sua confirmação, será realizado um plano de ação nesse sentido. O objetivo desse plano de ação é identificar quais os compostos que estão apresentando tempo de retenção muito próximo ou igual ao do sorbitol. É interessante salientar que a simples identificação dos compostos não significa que será possível separá-los do analito. O objetivo da identificação é avaliar a natureza desses

compostos e, conforme, avaliar a possibilidade de incrementar o pré-tratamento da amostra de forma a removê-los.

Assim sendo, novas ações foram planejadas e executadas. A **Figura 3** mostra a resolução entre

os dois picos inicialmente em análise. Já, na **Figura 4**, é possível identificar a presença de um terceiro analito que, anteriormente à utilização dos modificadores orgânicos, estava coelindo com um dos analitos.

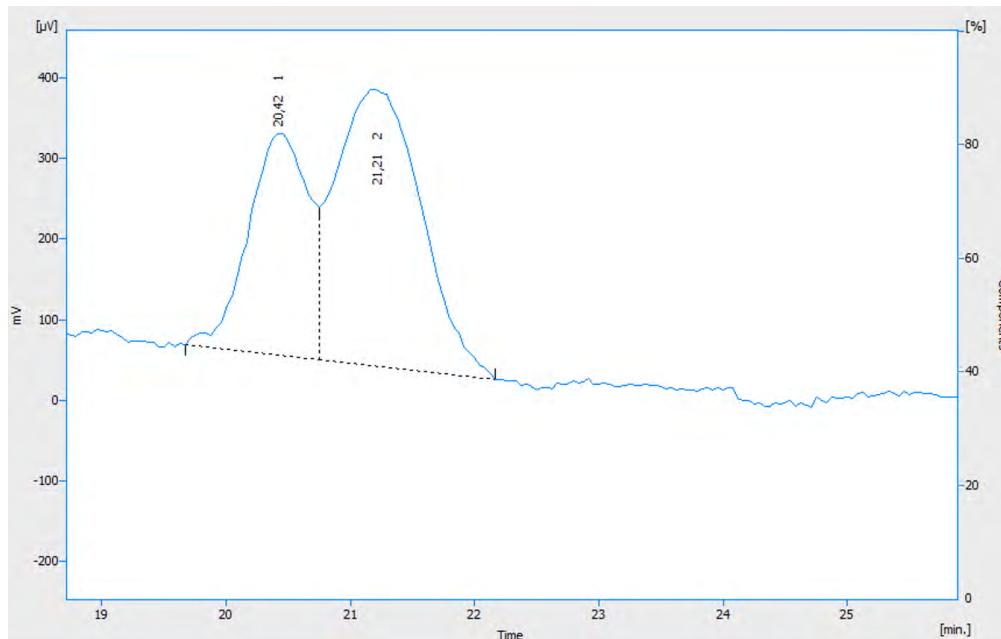


Figura 3. Cromatograma antes da utilização de modificadores orgânicos, com a presença de um interferente.

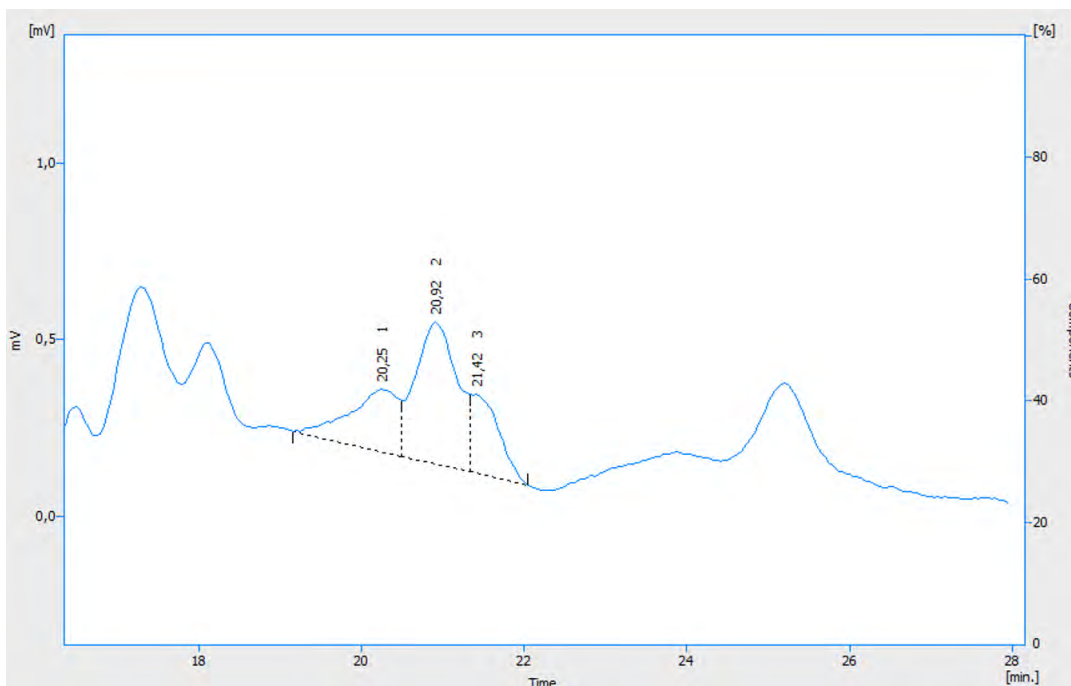


Figura 4. Cromatograma com a utilização de modificadores orgânicos, permitindo a identificação de um segundo interferente. Tempo de retenção: 20,25 min: Galactitol, 20,92 min: Xilitol e 21,42 min: Sorbitol.

Após consulta na literatura acompanhada pela injeção dos padrões nela mencionados, foi possível detectar os dois picos com tempo de retenção semelhantes ao do sorbitol. A Figura 4 mostra que o xilitol e o galacitol estavam atuando como interferentes no método antes de que fosse realizada essa separação com a fase móvel contendo os modificadores orgânicos.

A presença desses analitos em vinho e sucos já havia sido reportada por [19] e por [20]. Da mesma forma que o sorbitol, esses compostos orgânicos são poliálcoois, sendo derivados de carboidratos e contém, ao menos, um grupo funcional característico de álcoois. O galacitol, também conhecido como dulcitol, é um isômero do sorbitol. A identificação desses compostos é importante pois, a partir dela, seria possível compreender melhor a sua natureza química e, dessa forma, otimizar o pré-tratamento da amostra a fim de remover tais interferentes. No entanto, devido ao fato de que os interferentes são quimicamente muito semelhantes aos interferentes, a remoção através de um pré-tratamento torna esse processo mais complexo, inviabilizando-o. Dessa forma, não foi elaborado um plano de ação nesse sentido. Novamente, não sendo possível o bloqueio efetivo, estabeleceu-se um plano de ação considerando cada uma das possíveis causas consideradas no diagrama de Ishikawa. O plano de ação foi executado conforme planejamento e os resultados seguem conforme detalhado abaixo.

Uma das causas levantadas foi a preparação da amostra. Foram realizados ensaios considerando a natureza das membranas utilizadas para a filtração da amostra. Ou seja, foram utilizados filtros de seringa com caráter ora mais hidrofílico ora mais hidrofóbico. Considerando que, a natureza do filtro, juntamente com a sua porosidade, pudessem reter o analito. Também foi avaliada a possibilidade de diluição da amostra, sendo realizados com diluições de 2 e 4 vezes. Além disso, considerou-se a possibilidade de ajustar o pH da amostra como uma forma de preparação. Foram realizados testes com adição de substâncias básicas e de substâncias ácidas. Também foi injetada a amostra após ter sido neutralizada.

Outro fator importante em cromatografia é a semelhança da matriz da amostra com a matriz usada para preparação dos padrões usados na curva de calibração [14]. Embora o método original mencionasse que os padrões de calibração poderiam ser preparados com diluição em água, foram realizados testes usando como matriz para

esses padrões uma solução cuja composição buscava quimicamente se assemelhar a composição de um suco de uva.

Também foram revisadas as configurações do RI, repassando e reajustando as variáveis mais críticas mencionadas no manual do equipamento. O detector foi ajustado para que os seguintes parâmetros fossem respeitados: tensão entre 0 e 100 V, soma das tensões entre 4500 e 5500 V, tensão da lâmpada entre 2,6 e 3,6, ajuste ótico entre 0 e 20 %, temperatura interna estabelecida em 35 °C e pressão máxima de 6 bar.

Foram avaliadas também novas condições cromatográficas de fluxo e de temperatura, variando tais parâmetros dentro das especificações descritas no manual da coluna.

O plano de ações ainda incluía a possibilidade de alguma parte do equipamento estar danificada. A coluna é uma dos componentes mais sensíveis de um HPLC, ainda mais tratando-se de coluna com temperatura e fluxo mais específicos, como é o caso da coluna Aminex empregada. Essa coluna exige determinadas temperaturas para que seja possível aplicar um determinado fluxo. A combinação incorreta das variáveis temperatura e fluxo pode resultar na remoção de parte da fase estacionária da coluna por evaporação, tornando a coluna disfuncional. Assim, embora a coluna estivesse em acordo com todas as especificações necessárias segundo o certificado de teste realizado antes da aquisição, foi preparada uma solução contendo os mesmos analitos utilizados durante o teste realizado pelo fornecedor. Ao injetar essa solução, foi possível avaliar a resolução e o número de pratos da coluna e comparar os resultados com àqueles informados no certificado. Os valores obtidos indicavam que não havia avaria na coluna.

Este teste também permitiu descartar a hipótese de que havia danos na coluna devido ao seu mau condicionamento. A coluna sempre foi armazenada conforme as condições do manual (refrigerada de 0 a 10 °C e com água ultra). Colunas armazenadas com solventes inadequados em seu interior podem perder imediatamente sua funcionalidade, sendo perceptível, inclusive, através do obstrução da mesma e incapacidade de permear os solventes. A instalação incorreta do detector por índice de refração (RID) é uma das ramificações da causa de equipamento danificado. Ao ser instalado incorretamente, a célula do fluxo pode ser rompida devido ao aumento da pressão acima do seu limite máximo. O próprio equipamento dispõe

de meios para verificar danos na célula de fluxo. Após a realização destes testes, não foi observada nenhuma avaria.

Problemas de injeção podem resultar na variação das áreas e/ou do tempo de retenção dos picos. Foi analisada a presença de possíveis vazamentos no loop de injeção, na seringa e nas conexões entre os capilares. Além disso, foi reconfigurada a altura da agulha de injeção da amostra no sistema de injeção. Alturas incorretas podem resultar no acúmulo de amostra no injetor ou provocar curvaturas inapropriadas na agulha. Considerando-se que problemas de injeção podem ser avaliados independente da coluna, utilizou-se uma coluna empregada em outra análise para fazer os testes de problema de injeção. Novamente, não foi detectada nenhuma avaria.

A contaminação do sistema pode ser resultado de algum analito retido na coluna ou nas demais partes do sistema e com dificuldade para eluir. De forma geral, empregar solventes com diferentes polaridades é suficiente para resolver essa situação. Foram feitas aplicações de solventes com fluxos baixos e longos períodos de tempo (em média 6 horas). A ausência de picos ao injetar solvente puro indica que o sistema não estava contaminado.

A pré-coluna é utilizada como uma forma de aumentar a vida útil da coluna de separação. Conforme o uso, a coluna tende a sofrer danos, reduzindo gradativamente a capacidade de separação dos analitos. Estes danos tendem a se localizar em maior concentração na parte inicial de coluna, retendo compostos maiores ou até mesmo através da criação de caminhos preferenciais. Assim, é interessante o uso de uma pré-coluna que possa ser substituída com maior frequência e menor custo do que a coluna de separação. No entanto, a possibilidade de uso de pré-coluna nessa situação teria um segundo objetivo. Como a pré-coluna tem a mesma composição que a coluna de separação, de certa forma, ela é uma extensão da coluna, o que poderia resultar em um pequeno aumento da capacidade de separação e resolução dos picos. Sabe-se da existência de interferentes e da complexidade em separá-los na preparação da amostra. Um aumento no comprimento da coluna poderia ser capaz de proporcionar o aumento da resolução desejado. No entanto, as colunas são fabricadas com dimensões pré-determinadas, não sendo possível especificar as dimensões desejadas. Assim, o emprego de uma pré-coluna seria uma forma de adicionar alguns milímetros

de fase estacionária e, talvez, proporcionar uma melhora na resolução dos picos.

Antes, no entanto, de efetuar a aquisição de uma pré-coluna, serão avaliadas as demais possíveis causas da má resolução do pico de sorbitol uma vez que existem causas indicadas no diagrama de Ishikawa que independem de custos extras. Dentre elas, há o tempo de estabilização do RID. O detector por índice de refração é conhecido como detector universal por ser capaz de detectar todas as substâncias. Esta característica pode ser tanto uma vantagem quanto uma desvantagem. Desvantagem porque várias são as substâncias que podem atuar como interferentes, já que todas são detectadas. Outra desvantagem prática deste detector é o longo período requerido para estabilização. A presença de qualquer substância na célula de referência do detector pode causar distorções no cromatograma, tais como ondulações e picos. Dessa forma, foi feito um plano de ação para avaliar os efeitos dos diferentes tempos de estabilização do detector. Foram avaliados os tempos de 0,5, 1 e 5 h. Não foram observadas melhorias na resolução dos picos mesmo após o período de 5 h de estabilização, não sendo esta a causa raiz.

Problemas na primeira injeção após ligar o equipamento são comuns em ensaios cromatográficos. No entanto, esta possível causa foi descartada visto que, no decorrer dos demais testes, a baixa resolução dos picos foi observada após longos períodos de testes, não estando restrito às primeiras injeções do equipamento.

A última causa levantada no diagrama de Ishikawa refere-se à instalação inadequada dos equipamentos. Considera-se essa questão no sentido de que a cromatografia é um método analítico muito sensível, e pequenas diferenças podem retornar em resultados significativamente distintos. Quero dizer, com isso, que os equipamentos tem algumas restrições na forma como devem ser instalados. Para que a bomba tenha seu melhor desempenho, por exemplo, deve-se considerar colocá-la em uma posição em que a pressão dos solventes nos capilares atue a seu favor. Da mesma forma, o RID, por conter uma célula de fluxo facilmente quebrável através de pressão elevada, deve ser o último detector na linha, caso sejam instalados vários detectores em série.

Seguindo esta linha de raciocínio, a coluna de separação deve estar o mais próximo possível do detector, impedindo assim que o trabalho de

separar os analitos efetuado pela coluna não seja invalidado devido ao longo percurso percorrido dentro do capilar. Ao percorrer capilares longos, pode ser que os analitos já separados sejam submetidos à um fluxo menos laminar e mais turbulento, resultando na aproximação entre eles. Diâmetros e comprimentos de capilares excessivos tendem a favorecer tal situação.

Dessa forma, foi elaborado um plano de ação a fim de reduzir a distância do capilar entre o final da coluna de separação e a entrada do detector por índice de refração. Para tanto, é necessário reorganizar a forma como os módulos do HPLC estão dispostos. A estrutura original é conforme a Figura 5. Propõem-se a alteração da posição dos dois detectores. Ao trocar a posição do detector UV/Vis pela do RID, pode-se perceber que há redução

do comprimento do capilar representado pela linha em vermelho.

A redução no comprimento do capilar pode ser mais claramente visualizada conforme a Figura 6. O plano de ação foi, então, efetivamente realizado. O comprimento do capilar foi reduzido de 80 cm para 20 cm devido ao reposicionamento dos módulos dos detectores.

Foi, então, preparada e injetada a amostra contendo os dois interferentes. O cromatograma obtido, conforme o Figura 7, indicou que a ação proporcionou melhor separação entre os picos do sorbitol e dos interferentes, finalmente resolvendo a problemática da baixa resolução do pico do analito. Essa análise foi repetida ao longo de uma semana, a fim de verificar se as melhorias tinham mantinham a robustez.

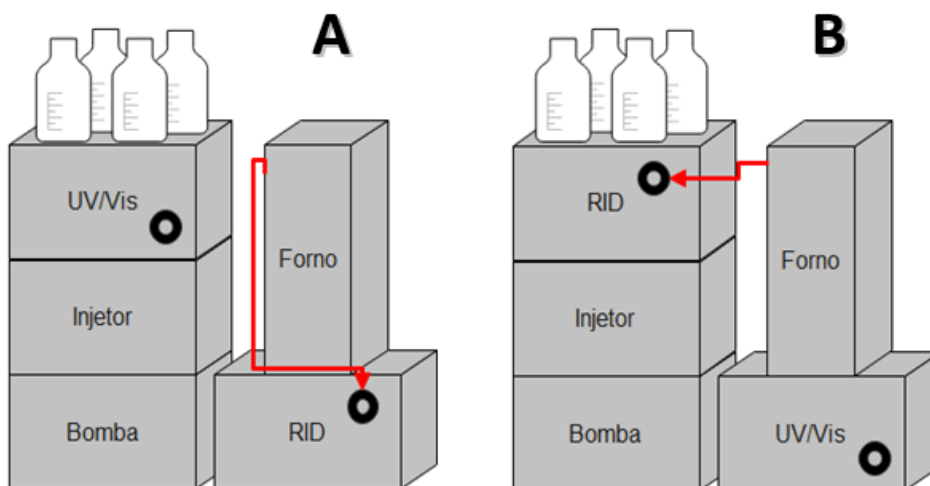


Figura 5. Instalação dos módulos do HPLC A) da forma original e B) proposta de acordo com o plano de ação. A linha em vermelho representa o capilar entre a saída da coluna de separação e a entrada do RID.

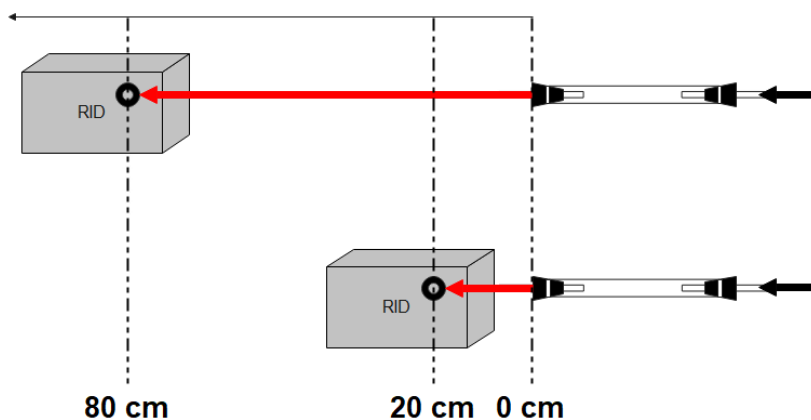


Figura 6. Diferença observada no comprimento do capilar após reposicionamento dos módulos dos detectores.

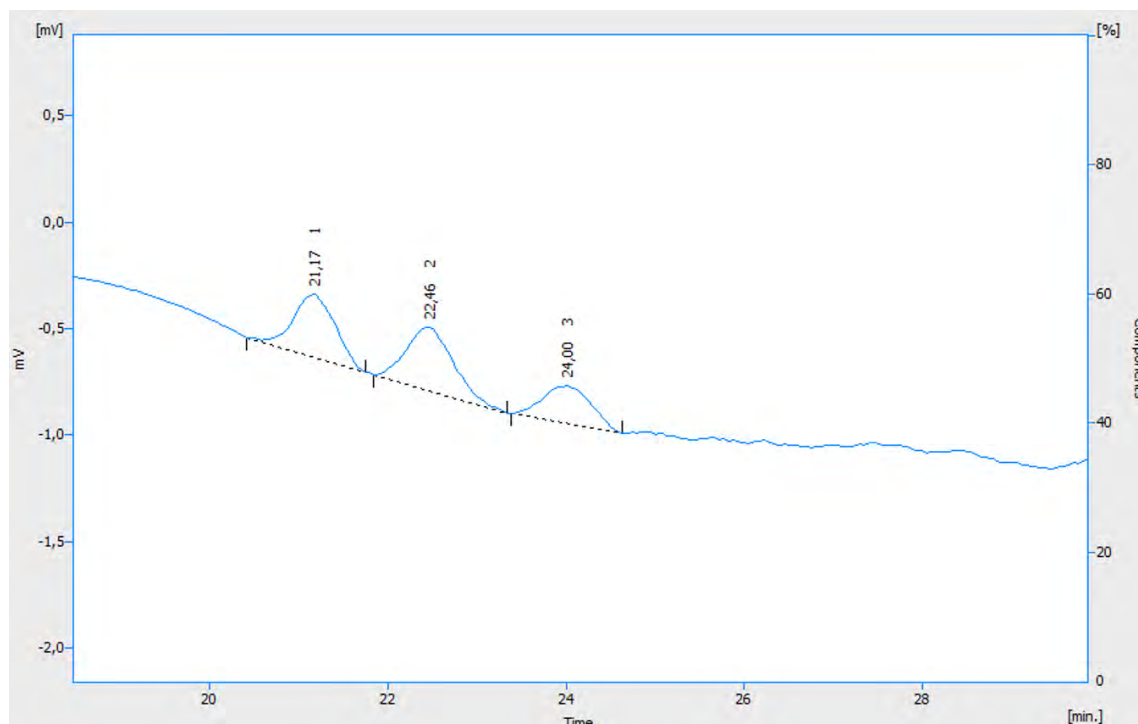


Figura 7. Cromatograma com a resolução dos picos otimizada. Tempo de retenção: 21,17 min: Galacitol, 22,46 min: Xilitol e 24,00 min: Sorbitol.

Dessa forma, também foi possível identificar a verdadeira causa-raiz. Embora a coluna de separação e o método estivessem adequados e proporcionando a resolução adequada do pico do sorbitol, o comprimento do capilar não permitia que esses resultados chegassem até o detector. Na Figura 8, os interferentes são representados por partículas brancas enquanto que o analito é

representado por partículas pretas. As partículas entram misturadas na coluna de separação e, devido às características da fase estacionária e da fase móvel, são separadas. No entanto, ao percorrer o capilar entre a saída da coluna de separação e a entrada do detector RID, os analitos aproximam-se novamente, resultando na perda de resolução da análise.

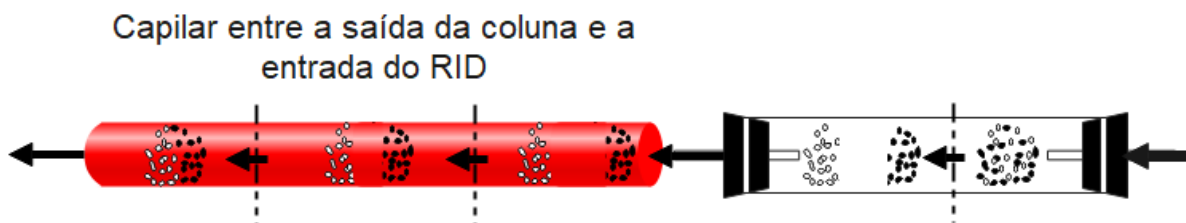


Figura 8. Representação da separação entre os analitos interferentes da amostra (partículas brancas) e o sorbitol (partículas pretas) desde à entrada na coluna de separação até o fim do capilar de entrada no RID.

Ao reposicionar os dois detectores, deve-se também perceber que, embora a distância entre a coluna e o RID tenha sido reduzida, houve ou aumento da distância do capilar que conecta a coluna com o detector UV/Vis. Dessa forma, também deve-se verificar se essa alteração não foi prejudicial para as demais análises.

Testes foram realizados ao longo de uma semana e não foram observadas variações nos demais métodos. Isso pode estar relacionado à concentração do analito em cada análise e à sensibilidade de cada detector em relação à cada analito.

Segundo o MASP, a sétima etapa é a de padronização a fim de evitar o reaparecimento do problema. Considerando-se que esse era um problema de um desenvolvimento de método e que a sua reincidência depende do novo reposicionamento dos módulos do equipamento, não é provável a sua reincidência. No entanto, a fim de garantir que ela não ocorra, foi realizado treinamento com os colaboradores do setor de cromatografia e foram feitos registros sobre a importância do posicionamento atual dos equipamentos. As lições aprendidas são válidas para futuros desenvolvimentos de outros métodos. A última etapa do MASP é a conclusão. No problema apresentado nesse artigo, o levantamento das possíveis causas através do diagrama de Ishikawa foi realizado e a análise de cada causa foi avaliada individualmente. Assim, foi possível identificar a causa raiz e atuar de forma a resolver o problema por ela ocasionado. O comprimento do capilar entre a saída da coluna de separação e a entrada do detector RID tem influência significativa na resolução dos picos dos analitos no cromatograma, sendo determinante, nesse caso, para a reprodução de um método para análise de sorbitol que seja seletivo e robusto.

Conclusões

Este artigo aplicou o MASP (Método de Análise e Solução de Problemas), com o objetivo de propor possíveis soluções ao problema de baixa resolução do pico do analito de sorbitol no desenvolvimento do seu método analítico.

O desenvolvimento desse método está direcionado à detecção de fraudes e adulterações em suco de uva tinto integral. A presença de concentrações de sorbitol acima do limite definido pela legislação no suco de uva integral indica que ele foi adulterado através da adição de suco de maçã, prática

motivada pela diferença de custo entre os dois produtos.

Nesse contexto, o MASP, através do uso de diferentes ferramentas da qualidade, proporcionou o levantamento de possíveis causas raiz. Planos de ação foram elaborados e aplicados individualmente para cada uma das 41 causas avaliadas. Embora algumas ações não tenham permitido solucionar por completo o problema, foram importantes para compreendê-lo melhor. A utilização de modificadores orgânicos, por exemplo, permitiu detectar a presença de um segundo interferente no método.

A utilização de um capilar menos extenso (20 cm = 25 % do comprimento original) entre a saída da coluna de separação do HPLC e a entrada do detector RID foi detectada como a causa raiz. As alterações cabíveis foram realizadas e a baixa resolução do pico do analito solucionada. Dessa forma, foi possível reproduzir um método seletivo e robusto para a quantificação do analito e para a detecção de fraudes em sucos de uva, uma vez que a resolução do pico de sorbitol (tempo de retenção de 24 min) foi superior a 1,00.

Assim, o objetivo deste trabalho foi alcançado. O MASP se destacou como metodologia para solucionar problemas, sendo extremamente simples, prático e de grande amplitude. Ele fez uso de diferentes ferramentas da qualidade, propiciando a sistematização da solução do problema de forma ordenada e lógica.

Referências

- [1] Kennedy SP, Gonzales P, ROUNGCHUN J. Coffee and tea fraud. En: Food Fraud. Academic Press; 2021. p. 139-150. doi.org/10.1016/B978-0-12-817242-1.00016-6
- [2] Cifuentes A. Comprehensive Foodomics: bioactivity quality safety omics. Amsterdam: Elsevier, 2021.
- [3] NÑEZ N, Saurina J, NÑEZ O. Non-targeted HPLC-FLD fingerprinting for the detection and quantitation of adulterated coffee samples by chemometrics. Food Control. 2021;124:107912. doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.107912
- [4] Perutka Z, Voženílek V, Šebela M. Wine Contaminations and Frauds From the Bioanalytical and Biochemical Points of View. En: Comprehensive Foodomics. Elsevier; 2021. p. 104-116. doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22835-7

- [5] Silvello GC, Bortoletto AM, de Castro MC, Alcarde AR. New approach for barrel-aged distillates classification based on maturation level and machine learning: a study of cachaça. *Lwt.* 2021;140:110836. doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110836
- [6] BRASIL, 1990. Decreto nº 99.066, de 8 de março de 1990.
- [7] Oliveira RRD, Almeida FPD, Paula JFD. A Aplicação do MASP para Reduzir os Acidentes de Trabalho nos Canteiros de Obra. Simpósio de Engenharia de Produção, 2017, Catalão (GO), 2017, Catalão. Engenharia e Desenvolvimento de Produtos e Processos, 2017.
- [8] Tavares MTJ. Validação de método HPLC-UV para determinação de impurezas genotóxicas (Dissertação Mestrado). Aveiro, Portugal: Universidade de Aveiro; 2011.
- [9] Martínez Mejía MJ. Desenvolvimento e Validação de métodos para a determinação de aminoglicosídeos em medicamentos veterinários (Dissertação Mestrado). São Paulo, Brasil: Universidade Estadual de Campinas; 2013.
- [10] Aragão NMD, Veloso MCDC, Andrade JBD. Validação de métodos cromatográficos de análise – um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da “Química Verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. *Quím. Nova.* 2009;32(9):2476-81. doi.org/10.1590/S0100-40422009000900043
- [11] Albano FDM, Raya-Rodriguez MT. Validação e Garantia da Qualidade de Ensaios Laboratoriais: guia prático. Brasil: Porto Alegre: Rede Metrológica RS; 2009.
- [12] Castro RSD. Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de fármacos mediante cromatografia líquida de alta eficiência utilizando planejamento multivariado (tese de graduação). Porto Alegre, Brasil: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2018.
- [13] Lima, ACD, Quiarato MA, Correa THP, Fuzeto AP. Aplicação e desenvolvimento do MASP (método de análise e soluções de problemas) em instituição sem fins lucrativos. Associação Brasileira de Engenharia de Produção. XXXVII Encontro Nacional De Engenharia De Producao; 2017 out 10-13; Joinville, Brasil. 2017. p. 1-19.
- [14] Lanças, FM. Cromatografia Líquida Moderna: HPLC/CLAE. Brasil: Editora Átomo; 2009.
- [15] Grefstad, AP. Kvantitativ analyse med høyopløselig væskechromatografi og tandem massespektroskopi på perfluoroktansyre og perfluoroktansulfonat i vann behandlet med aktivt kull og karbonfiber ved ulike betingelser. (Dissertação Mestrado). Ås, Noruega: Universidade Norueguesa de Ciências da Vida; 2015.
- [16] Nesi J. Aplicação do método de análise e solução de problemas (MASP) em uma empresa de fabricação de painéis de alumínio (trabalho de especialização). Paraná, Brasil: Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão; 2019.
- [17] Lorenzon E. Utilização do MASP (Método De Análise E Solução De Problemas) em uma granja de suínos. (Doutorado). Rio Grande do Sul, Brasil: Universidade do Vale do Taquari - Univates, Lajeado; 2018.
- [18] BIO-RAD. Guidelines for use and care of Aminex resin-based columns: instruction manual. Califórnia: Bio-Rad, 2020. 19 p..
- [19] Ruiz-Matute AI, Sanz ML, Moreno-Arribas MV, Martínez-Castro I. Identification of free disaccharides and other glycosides in wine. *Journal Of Chromatography A.* 2009;1216(43):7296-7300. doi.org/10.1016/j.chroma.2009.08.086
- [20] Fuleki T, Pelayo E. Sugars, alcohols, and hydroxymethylfurfural in authentic varietal and commercial grape juices. *Journal of AOAC International.* 1992;76(1):59-66. doi.org/10.1093/jaoac/76.1.59