

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Marília Melina May

**DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM
BEBIDAS À BASE DE SOJA EMPREGANDO MÉTODO
QuEChERS E UHPLC-MS/MS**

**Santa Maria, RS
2016**

Marília Melina May

**DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM BEBIDAS À BASE
DE SOJA EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS E UHPLC-MS/MS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Química**.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Martha Bohrer Adaime

Santa Maria, RS
2016

Marília Melina May

**DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM BEBIDAS À BASE
DE SOJA EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS E UHPLC-MS/MS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Química**.

Aprovado em 26 de fevereiro de 2016:

**Martha Bohrer Adaime, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientador)**

Maria Tereza Friedrich, Dra. (UPF)

Renato Zanella, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS
2016

Dedico esse trabalho àqueles que são meus
exemplos de vida, de amor, de caráter e de
humildade. Por quem sempre me empenhei em
fazer o meu melhor.
Aos meus primeiros mestres, que me repassaram
em valores os ensinamentos mais preciosos.
Mãe e pai, essa conquista é por vocês!

AGRADECIMENTOS

Durante toda a vida, conhecemos pessoas que passam deixando um pouco da sua bagagem e outras que permanecem, vindo a tornar-se parte da nossa. Tanto os que passam quanto os que ficam possuem papel fundamental na criação da nossa história e da nossa essência. Nesta etapa da minha história, diversas pessoas passaram e permaneceram, contribuindo para minha evolução profissional e pessoal. A todas elas a minha gratidão.

Agradeço primeiramente à Deus, que me presenteou com o sopro da vida e deu forças para que persistisse e chegasse até aqui, iluminando sempre minhas escolhas e permitindo que o melhor caminho, mesmo que tortuoso, fosse seguido.

Aos meus pais, Clarisse e Aldo, me faltam palavras pra expressar a eterna gratidão que sinto por vocês, que sempre me incentivaram a estudar e seguir o caminho que eu escolhi, mantendo a humildade e a retidão. Perdão pelas minhas ausências! Amo vocês! À minha mãe, que me ensinou valores preciosos, que dedica sua vida a cuidar da família, além dos compromissos do trabalho. Que espera o fim de semana ansiosa, com a mesa cheia de “comida de mãe” e aquele abraço cheio de ternura, que faz com que todos os problemas se dissolvam. Ela me ensinou a ler e escrever, a cuidar da casa (tentou, pelo menos!) e com ela aprendi que cozinhar é uma forma de amar os outros. Por todos esses e tantos outros ensinamentos, por toda a ajuda para que eu concluísse mais essa etapa, muito obrigada, mãe! Ao meu pai, meu herói! Não de conto de fadas, mas aquele que levanta cedo todos os dias e batalha pra garantir que os nossos sonhos possam ser realizados. Ele que me ensinou que o estudo é a melhor herança que poderia me deixar e nunca mediu esforços para que o melhor fosse feito, que está sempre disposto a conversar, aconselhar e dar aquele “colinho de pai” que é capaz de melhorar qualquer dia ruim. Pelos teus ensinamentos, pelo esforço para garantir que eu chegasse até aqui, muito obrigada, Pai!

Aos meus irmãos, Michele e Pablo, companheiros da minha vida! Eles, que me protegem e ensinam desde que nasci, os exemplos que tenho a serem seguidos. Obrigada pelos conselhos, pelas brigas, brincadeiras e amor incondicional. Ainda, obrigada mana, por ter nos dado de presente o Eduardo e a Clahra, que são a alegria da nossa família e certamente contribuíram durante esse período, trazendo leveza aos meus dias! Quando eu crescer, quero ser que nem vocês!

À minha grande família... Obrigada simplesmente por estarem sempre presentes, pela convivência, por fazerem a diferença na minha vida, um a um. Agradeço imensamente por ter uma estrutura familiar como a nossa!

Ao Prof. Dr. Renato Zanella, por ter aberto as portas do laboratório para mim, por me dar a oportunidade de fazer parte do grupo LARP, pelo exemplo profissional que repassa aos seus alunos e pelas contribuições na banca e durante esses dois anos. Muito obrigada!

À Prof. Dra. Martha Bohrer Adaime, por aceitar o desafio de me orientar, mesmo que à distância, e permitir que eu entrasse no grupo LARP. Pela dedicação e contribuição a este trabalho, pelos ensinamentos em aula e nas conversas paralelas, pelo exemplo profissional e de sucesso. Obrigada por mostrar que o bom humor e a dedicação são fundamentais em qualquer carreira!

Ao Prof. Dr. Osmar Damian Prestes, pela co-orientação, pelo auxílio na execução do trabalho e paciência para realizar correções. Pela amizade e pelos ensinamentos em aula, durante as trocas de ideia e nos cafés e lanches na cozinha. Obrigada pela disponibilidade e paciência em ajudar na execução do trabalho e pelos momentos de descontração durante esses dois anos!

À Prof. Dra. Maria Tereza Friedrich, pela dedicação e contribuição na realização deste trabalho, por compartilhar conhecimento e auxiliar para que o trabalho fosse melhorado. Muito obrigada!

Aos meus amigos e colegas do LARP... Ah! Aí fica difícil expressar a gratidão! O sucesso de um trabalho depende da equipe que nos cerca e contribui pra isso. E vocês foram sensacionais! Muito obrigada por me receberem tão bem, por me fazerem sentir em casa em tão pouco tempo... Pela ajuda no trabalho, troca de conhecimentos, opiniões, descontração no café, parceria nos churrascos, por elogiarem minhas comidas e pelo apoio quando as coisas pareciam não dar certo. Cada um de vocês da família LARP contribuiu de alguma forma pro meu crescimento profissional e pessoal, e de cada um de vocês eu arranquei algum tipo de aprendizado. Não tenho como deixar de agradecer especialmente à Giovana e ao Nelson, que me ajudaram diretamente durante a execução de todo o trabalho, segurando as pontas quando eu me encontrava no limite e sempre dispostos a ensinar, a me ajudar. Vocês foram muito mais que colegas, foram amigos-irmãos no laboratório. Minha eterna gratidão! Outras pessoas também merecem destaque nessa caminhada. A Tiele, sempre com muita paciência, disposta a esclarecer

dúvidas e compartilhar os conhecimentos sobre o equipamento. Muito obrigada! As gurias que acompanharam toda a caminhada dentro e fora do laboratório, com quem pude construir amizades que levarei pra vida... Juliana, Giovana, Marisa, Mariela, Janice, Danieli... Obrigada, obrigada, obrigada! Por compartilhar com vocês absolutamente tudo, por serem minhas confidentes, amigas, parceiras, colegas, pelos ensinamentos, caronas, almoços, festas... Enfim, certamente sem vocês eu não teria chegado aqui! Amo vocês!

Minha eterna gratidão aos meus amigos, impossível citar todos! Aqueles que chegaram e permaneceram na minha vida. Os que estavam presentes nos melhores e piores momentos, pra aconselhar ou simplesmente ouvir, pra extravasar as emoções ou simplesmente abraçar em silêncio. Cada um de vocês é uma peça fundamental na minha história e no meu jeito de ser. Aqueles que muitas vezes atrapalharam a execução desse trabalho, chamando pra sair e sabendo da minha dificuldade em recusar convites... Com certeza essa caminhada foi muito mais leve com a companhia de cada um de vocês! Muito obrigada por estarem comigo e por conseguirem arrancar sempre o melhor de mim! Amo vocês!

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) pela contribuição na minha formação acadêmica.

Ao Ademir e à Valéria, funcionários da coordenação do PPGQ pela dedicação na realização das tarefas fundamentais que realizam.

Ao CNPq, CAPES, FINEP, SIBRATEC e RENALI pelo auxílio financeiro e apoio a pesquisa.

RESUMO

DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM BEBIDAS À BASE DE SOJA EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS E UHPLC-MS/MS

AUTORA: Marília Melina May
ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Martha Bohrer Adaime

Bebidas à base de soja são extratos aquosos do grão de soja, que representam uma fonte de proteínas de alta qualidade e não contém colesterol ou lactose, podendo ser consideradas alimentos funcionais. Essas bebidas têm grande aceitabilidade entre consumidores e por serem extraídas do grão, os componentes benéficos são preservados, mas também podem conter resíduos de agrotóxicos empregados para controlar a infestação de pragas durante o cultivo dos grãos. O presente trabalho teve por objetivo desenvolver e validar um método multirresíduo baseado na extração por QuEChERS para a determinação simultânea de 41 agrotóxicos em bebidas à base de soja por meio de cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS). Na etapa de preparo de amostra, utilizou-se 10 mL de amostra e 10 mL de acetonitrila e adição de sais. O procedimento de limpeza dos extratos foi otimizado a partir de planejamento experimental, avaliando diferentes quantidades dos sorventes amina primária secundária (PSA) e octadecilsilano (C18). A etapa de limpeza dos extratos foi realizada com sulfato de magnésio anidro e C18. Para avaliar a exatidão do método, amostras branco foram fortificadas nos níveis de 10, 25 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$, com $n = 6$. Para avaliação do efeito matriz foram comparadas as inclinações de curvas em acetonitrila e no extrato branco da matriz. Os resultados da validação foram satisfatórios, já que o método otimizado apresentou recuperações entre 70 e 112%, com RSD menor que 19%. As curvas foram preparadas no extrato da matriz, devido a alguns compostos apresentarem efeito matriz acentuado. Foi obtido $r^2 \geq 0,99$ para todos os compostos, na faixa entre os respectivos limites de quantificação e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$. O método provou ser adequado para a determinação dos compostos e pode ser utilizado para análises de rotina.

Palavras Chave: bebidas à base de soja, agrotóxicos, QuEChERS, planejamento experimental, UHPLC-MS/MS.

ABSTRACT

MULTIRESIDUE DETERMINATION OF PESTICIDES IN SOY-BASED BEVERAGES USING A QuEChERS METHOD AND UHPLC-MS/MS

AUTHOR: Marília Melina May
ADVISOR: Prof^a. Dr^a. Martha Bohrer Adaime

Soy beverages are aqueous extracts of soybeans which are a source of high quality protein and no contains cholesterol or lactose, can be considered functional foods. These beverages have a large acceptance among consumers and due to they are extracted from the grain, the beneficial components are preserved, but may also contain residues of pesticides used to control pest infestation during the growing of the grains. This study aimed to develop and validate a multiresidue method based on QuEChERS extraction for the simultaneous determination of 41 pesticides in soy-based beverages using ultra-high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). In the sample preparation step, it was used 10 mL of sample and 10 mL of acetonitrile and addition of salts. The clean-up procedure was optimized by experimental design, evaluating different quantities of the sorbents primary secondary amine (PSA) and octadecylsilane (C18). The clean-up step was performed with magnesium sulfate anhydrous and C18. To assess the accuracy of the method, blank samples were spiked at 10, 25 and 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ with $n = 6$. To evaluate the matrix effect, inclinations of curves in acetonitrile and blank extract of the matrix were compared. The results of the validation are satisfactory, since the method presented optimized recoveries between 70 and 112% with RSD less than 19%. Curves were prepared in the matrix extract, due to some compounds presented pronounced matrix effect. The curves showed $r^2 \geq 0,99$ for all compounds in the range between the respective limit of quantification and 50 $\mu\text{g L}^{-1}$. The method proved to be suitable for the determination of the compounds and may be used for routine analysis.

Keywords: soy-based beverages, pesticides, QuEChERS, experimental design, UHPLC-MS/MS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Mapa da produção agrícola de soja no Brasil (CONAB, 2016)	20
Figura 2 -	Produção anual de soja dos principais produtores mundiais - em milhões de toneladas (CONAB, 2016)	21
Figura 3 -	Representação das etapas do método QuEChERS (A) original, (B) acetato, (C) citrato.	31
Figura 4 -	Esquema da fonte de ionização ESI (AB SCIEX, 2006)	35
Figura 5 -	Esquema de analisador de massas triploquadrupolo (AB SCIEX, 2010)	36
Figura 6 -	Planejamento fatorial de dois níveis com ponto central (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).	37
Figura 7	Planejamento fatorial em estrela para duas variáveis codificadas (adaptado de NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).	38
Figura 8 -	Procedimentos de extração e limpeza empregados para otimização do método e teste gravimétrico.	50
Figura 9 -	((a) cromatograma de íons totais obtido por meio de UHPLC-MS/MS a partir de uma solução de 20 µg L ⁻¹ preparado na matriz, cromatograma (B) SRM de alguns compostos representativos.	58
Figura 10 -	Resíduos restantes após diferentes extrações e limpezas avaliadas por teste gravimétrico.	59
Figura 11 -	Resultados em porcentagem do número de compostos com recuperação satisfatória (70-120%, RSD ≤20%) nos ensaios realizados para o planejamento fatorial.	61
Figura 12 -	Superfícies de resposta geradas pelo planejamento experimental para os compostos (a) ácido giberélico, (b) imazaquin, (c) alacloro e (d) bentazona.	62
Figura 13 -	Resíduos remanescentes etapa de limpeza com base no planejamento experimental avaliados por teste gravimétrico	63
Figura 14	Superfícies de resposta dos compostos (a) miclobutanil, (b) etofenprox e (c) sulfentrazone gerados pelo planejamento experimental.	64
Figura 15-	Representação do método utilizado na determinação de resíduos de agrotóxicos em bebidas à base de soja, utilizando método QuEChERS citrato.	66
Figura 16 -	Demonstração da ausência de picos cromatográficos de interferentes no tempo de retenção do composto dimetenamida-P nas amostras (a) branco reagente e (b) amostra branco e (c) pico cromatográfico de composto dimetenamida-P fortificado na matriz no nível 20 µg L ⁻¹ .	67
Figura 17 -	Curvas analíticas preparadas no solvente e no extrato branco da matriz para os compostos (a) carbendazim e (b) clorfluazurom	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição nutricional em 100 g de soja e bebidas à base de soja.	23
Tabela 2 -	Parâmetros avaliados durante a etapa de validação de métodos analíticos.	41
Tabela 3 -	Informações sobre os agrotóxicos estudados e Limites Máximos de Resíduos para grãos de soja.	46
Tabela 4 -	Condições dos ensaios realizados no planejamento experimental para otimização das condições de limpeza.	51
Tabela 5 -	Gradiente linear de fase móvel do sistema UHPLC-MS/MS.	55
Tabela 6 -	Agrotóxicos e respectivos tempos de retenção, íons precursores, íons produto, energias de colisão e voltagem do cone.	56
Tabela 7 -	Regressão linear para a curva analítica preparada em acetonitrila.	68
Tabela 8 -	Regressão linear para a curva analítica preparada em extrato branco da matriz.	69
Tabela 9 -	Avaliação do efeito matriz dos agrotóxicos avaliados.	71
Tabela 10 -	Percentuais de recuperação e RSD para repetitividade e precisão intermediária do método.	76

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

- ACN – acetonitrila
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- APCI – Ionização Química à Pressão Atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*
- APPI – Fotoionização à Pressão Atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Photoionization*
- C18 – Octadecilsilano
- CID – Dissociação Induzida por Colisão, do inglês *Collision-Induced Dissociation*
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento
- CTM – Curva de trabalho na matriz
- CTS – Curva de trabalho em solvente
- DAD – Detector por Arranjo de Diodos, do inglês *Diode Array Detector*
- DC – Corrente Direta, do inglês *Direct Current*
- d.p – diâmetro de partícula
- d-SPE – Extração em Fase Sólida Dispersiva, do inglês *Dispersive Solid Phase Extraction*
- ECD – Detector por Captura de Elétrons, do inglês *Electron Capture Detector*
- EM – Efeito matriz
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- ESI – Ionização por Eletronebulização, do inglês *Electrospray Ionization*
- eV – Elétrons volt
- FPD - Fotometria de chama, do inglês *Flame Photometric Detection*
- GC - Cromatografia Gasosa, do inglês *Gas Chromatography*
- GC-ECD - Cromatografia Gasosa com detector de captura de elétrons, do inglês *Gas Chromatography with Electron Capture Detector.*
- GC-MS – Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês *Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry*
- GC-MS/MS – Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas em série, do inglês *Gas Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry*
- GCB - Carbono Grafitizado, do inglês *Grafitized Carbon Black*
- ha – Hectares
- HAc – Ácido acético
- HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*
- IDA – Ingestão Diária Aceitável
- INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
- ISO/IEC - *International Organization for Standardization/ International Electrotechnical Commission*
- kcal – Quilocaloria
- K_{ow} – Coeficiente de partição octanol/água
- LARP – Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas
- LC - Cromatografia Líquida, do inglês *Liquid Chromatography*
- LC-MS/MS – Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em série, do inglês *Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry*
- LMR – Limite Máximo de Resíduo
- LOD – Limite de Detecção, do inglês *Limit of Detection*
- LOQ – Limite de Quantificação, do inglês *Limit of Quantification*

m/z – Razão massa carga
MAE – Extração Assistida por Microondas, do inglês *Microwave Assisted Extraction*
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MgSO₄ – Sulfato de magnésio anidro
MS – Espectrometria de Massas, do inglês *Mass Spectrometry*
MS/MS – Espectrometria de Massas em série, do inglês *Mass Spectrometry in tandem*
MSPD – Dispersão da Matriz em Fase Sólida, do inglês *Matrix Solid Phase Dispersion*
N₂ – Nitrogênio
NaCl – Cloreto de sódio
NPD – Detector de Nitrogênio e Fósforo, do inglês *Nitrogen Phosphorus Detector*
p.a. – Grau pró-análise
PARA - Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
pH – Potencial Hidrogeniônico
PI – Padrão Interno
PNCRC – Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
PC – Padrão Controle
PLE - Extração Acelerada por Solventes, do inglês *Pressurized Liquid Extraction*
PSA – Amina Primária Secundária, do inglês *Primary Secondary Amine*
Q1 – Primeiro quadrupolo
Q2 – Segundo quadrupolo ou cela de colisão
Q3 – Terceiro quadrupolo
QuEChERS – Rápido, fácil, econômico, robusto e seguro, do inglês *Quick, Easy, Cheap, Rugged and Safe*
r² – Coeficiente de Determinação
RF – Rádio Frequência
RSD – Desvio Padrão Relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*
RSD_{pi} – Desvio Padrão Relativo para Precisão Intermediária
RSD_r – Desvio Padrão Relativo para Repetitividade
RSM – Metodologia de Superfície de Resposta, do inglês *Response Surface Methodology*
SANCO – Saúde e Proteção do Consumidor, do francês *Santé et protection des consommateurs*
SBSE - extração sortiva em barra magnética, do inglês *Stir Bar Sorptive Extraction*
SFE - Extração por Fluido Supercrítico, do inglês *Supercritical Fluid Extraction*
SPE – Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*
SPME – Microextração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Micro Extraction*
S/R – Sinal/ruído
SRM – Monitoramento de Reações Seleccionadas, do inglês *Selected Reaction Monitoring*
TIC – Cromatograma do Íon Total, do inglês *Total Ion Chromatogram*
t_R – Tempo de retenção
UFMS – Universidade Federal de Santa Maria
UHPLC – Cromatografia líquida de ultra alta eficiência, do inglês *Ultra High Performance Liquid Chromatography*

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 -	Fórmulas estruturais dos agrotóxicos estudados nesse trabalho	91
Anexo 2 -	Superfícies de resposta dos agrotóxicos geradas por planejamento experimental	97

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 ORIGEM DA SOJA NO BRASIL	19
2.2 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA	19
2.3 CARACTERÍSTICAS NUTRICIONAIS DA SOJA E PRODUTOS DERIVADOS	21
2.4 BEBIDAS À BASE DE SOJA	23
2.5 RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS	25
2.6 TÉCNICAS DE PREPARO DE AMOSTRAS EMPREGADAS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS	27
2.6.1 Método QuEChERS	29
2.7 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS	32
2.7.1 Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS)	33
2.8 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS	36
2.9 PADRÃO INTERNO E PADRÃO DE CONTROLE	39
2.10 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS	39
3 MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1 INSTRUMENTAÇÃO	42
3.2 MATERIAL, REAGENTES E SOLVENTES	43
3.3 ESCOLHA DOS COMPOSTOS	43
3.4 ESCOLHA DO PADRÃO INTERNO E DO PADRÃO DE CONTROLE	44
3.5 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS	44
3.6 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE DETERMINAÇÃO POR UHPLC-MS/MS	48
3.7 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM BEBIDAS À BASE DE SOJA POR UHPLC- MS/MS	48
3.7.1 Teste gravimétrico	49
3.7.2 Planejamento fatorial 2²	50
3.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM BEBIDAS À BASE DE SOJA POR UHPLC- MS/MS	51

3.8.1 Seletividade	51
3.8.2 Curva analítica e faixa de trabalho	52
3.8.3 Efeito matriz.....	52
3.8.4 Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)	53
3.8.5 Exatidão e precisão.....	53
3.9 APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS REAIS	53
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1 OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA UHPLC-MS/MS PARA A DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM BEBIDAS À BASE DE SOJA.....	55
4.2 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM BEBIDAS À BASE DE SOJA	58
4.2.1 Planejamento fatorial 2².....	60
4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO OTIMIZADO	66
4.3.1 Seletividade	66
4.3.2 Faixa de trabalho e curva analítica	68
4.3.3 Efeito matriz.....	70
4.3.4 Limite de detecção e quantificação	74
4.3.5 Exatidão e precisão.....	74
4.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS REAIS	78
4.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	78
5 CONCLUSÃO	80
6 DESTINAÇÃO DOS RESÍDUOS GERADOS	82
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
ANEXO 1.....	91
ANEXO 2.....	97

1 INTRODUÇÃO

A soja é uma leguminosa cultivada no Brasil desde a década de 50 e representa grande importância econômica para o país, já que esta cultura ocupa lugar entre os principais setores exportadores do agronegócio (DALL'AGNOL *et al.*, 2007; CONAB, 2016). A soja se destaca pelos benefícios à saúde que têm sido amplamente estudados e divulgados, seu consumo está relacionado à diminuição do risco de diversas doenças, além de possuir efeitos antiinflamatórios e antioxidantes (CALLOU, 2009; DURANTI, 2006). Apesar disso, não é muito consumida por ser desagradável ao paladar. Entretanto, diversos produtos derivados têm sido formulados com aprimoramento das características sensoriais, para contornar o sabor desagradável e aumentar o consumo desses alimentos funcionais (BENASSI *et al.*, 2012; CALLOU, 2009). As bebidas à base de soja são bastante consumidas, devido às características sensoriais e da oferta constante de produtos com sabores diferenciados (JAEKEL *et al.*, 2010). O processo de produção das bebidas à base de soja é feito a partir do extrato de soja, o que permite que as suas características nutricionais e funcionais sejam responsáveis pelos mesmos benefícios à saúde oferecidos pelo grão (ANDRÉS *et al.*, 2014). Inicialmente, seu consumo era restrito a pessoas com intolerância à lactose, vegetarianos e indivíduos com restrições alimentares, hoje é promovido como alternativa saudável ao leite bovino, por ser rico em proteínas de alta qualidade (fornece ao organismo os aminoácidos essenciais na quantidade necessária) e não possuir colesterol ou lactose (IÇIER *et al.*, 2015).

Apesar dos benefícios dessas bebidas, devido ao seu processo de produção elas podem conter resíduos de agrotóxicos utilizados na cultura da soja para controle de pragas e infestações. A presença de resíduos e contaminantes é motivo de preocupação no âmbito da saúde pública, exigindo investimento e organização para implementar ações de controle, bem como o desenvolvimento de substâncias menos agressivas ao homem e ao meio ambiente (SOARES, 2010).

A cultura da soja atualmente é responsável por 56% do faturamento do setor de vendas de agrotóxicos, sendo a que mais utiliza estes compostos no país (SINDIVEG, 2015). Os resíduos possivelmente presentes no grão, nas bebidas e outros produtos derivados são potencialmente tóxicos ao homem (CALDAS & SOUZA, 2000). Para evitar ou reduzir a ocorrência de intoxicações causadas por agrotóxicos, é realizado o monitoramento dos resíduos em alimentos e amostras às

quais a exposição humana é passível, tendo como base os Limites Máximos de Resíduos (LMR) estabelecidos por agências regulamentadoras em diversos países (SOLER *et al.*, 2005).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o órgão regulamentador que estabelece limites máximos de resíduos de agrotóxicos em diversas matrizes. Apesar da cultura de soja ser a que mais demanda agrotóxicos, os programas que avaliam a presença de resíduos nos alimentos de origem vegetal não fazem controle dos seus produtos derivados. É importante salientar que atualmente não há legislação que estabeleça limites máximos de resíduos de agrotóxicos em bebidas à base de soja, dificultando assim o controle do uso indiscriminado desses compostos e preservação da saúde da população.

Para garantia da segurança do alimento, o monitoramento da presença de resíduos em possíveis fontes de exposição humana deve ser feito através de métodos analíticos rápidos, seletivos e sensíveis. As técnicas cromatográficas são amplamente utilizadas, destacando-se pela possibilidade de análises qualitativas e quantitativas. Nos últimos anos, a cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS) tem se destacado como técnica preferencial (CHIARADIA *et al.*, 2008). A determinação em matrizes complexas, com alto teor de gordura, açúcar e proteínas, requer atenção especial na etapa de preparo de amostra, pois demanda extratos com baixa concentração de interferentes e que contenham os analitos de interesse.

Baseado na importância do consumo das bebidas à base de soja para a saúde e para garantir que os alimentos consumidos pela população sejam seguros e de qualidade, esse trabalho teve por objetivos otimizar e validar um método para determinação multirresíduo de agrotóxicos nessas bebidas. Empregou-se o método QuEChERS como preparo de amostra, otimizado a partir de testes preliminares e de planejamento experimental, e UHPLC-MS/MS para detecção e quantificação dos compostos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ORIGEM DA SOJA NO BRASIL

A soja (*Glycine max (L.) Merrill*) é uma leguminosa originária da China, onde é produzida há mais de cinco mil anos. Nos seus primórdios, era uma planta rasteira, sendo evoluída a partir de cruzamentos naturais entre duas espécies de soja selvagem, que foram domesticadas e melhoradas por cientistas (DALL'AGNOL *et al.*, 2007).

No Brasil, os primeiros materiais genéticos do grão foram trazidos dos Estados Unidos e testados na Bahia, em 1882, não apresentando êxito na cultura devido às condições climáticas. Em 1900, a soja foi testada no Rio Grande do Sul e em 1914 o seu cultivo foi realmente introduzido. Entretanto, somente a partir da década de 40 adquiriu importância econômica, pois até então o propósito era avaliar o desempenho dos grãos para produção forrageira (BONATO & BONATO, 1987).

Até o início da década de 50, a produção da soja esteve concentrada no Oriente e em 1942 os Estados Unidos já ocupavam o primeiro lugar na produção mundial do grão. Atualmente, é o principal grão oleaginoso cultivado no mundo, fazendo parte do conjunto de atividades agrícolas com maior destaque no mercado mundial (HIRAKURI *et al.*, 2014). O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, com produção estimada de 100 milhões de toneladas na safra 2015/2016. A área plantada é de 33.228,4 milhões de hectares (ha), tendo produtividade média de 3.073 kg/ha (CONAB, 2016).

O Rio Grande do Sul é o terceiro estado brasileiro com maior produção do grão, ficando atrás apenas dos estados do Mato Grosso e do Paraná, respectivamente.

2.2 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

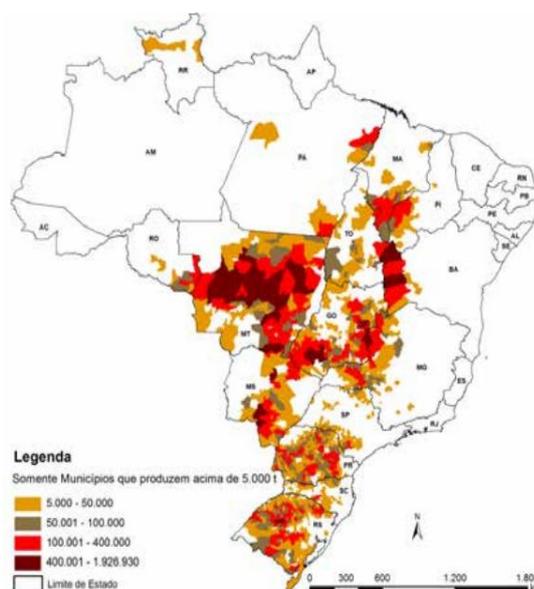
A cultura de soja representa a modernização da agricultura brasileira, que passou de importadora para a segunda maior exportadora de alimentos do mundo, em menos de 40 anos. A soja faz parte do conjunto de atividades agrícolas com maior destaque no mercado mundial, sendo a principal oleaginosa cultivada no

mundo (HIRAKURI & LAZZAROTTO 2014). Dentre os grandes produtores mundiais, o Brasil é o que possui o maior potencial de expansão da área cultivada, podendo tornar-se o maior produtor mundial, aliado ao domínio tecnológico que possui para produzir em regiões tropicais com baixas latitudes. Atualmente, o complexo soja ocupa 49% da área plantada em grãos do país (Figura 1). O último levantamento realizado pela CONAB aponta incremento em área plantada de 3,5% em relação ao ano anterior, atingindo o intervalo de 32,8 a 33,3 milhões de hectares (CONAB, 2016).

O elevado teor em proteínas presente no grão de soja faz dela a principal matéria prima na fabricação de rações para alimentação de animais domésticos e também a fonte de proteína vegetal mais consumida para produzir proteína animal. Assim, contribui para a competitividade nacional na produção de ovos, leite e carnes, em especial de aves, bovinos e suínos. Não obstante, devido ao teor de óleo, disputa com a palma a posição de maior produtora mundial de óleo vegetal (HIRAKURI *et al.*, 2014).

Na safra 2014/15 a produtividade da soja foi de 2.999 kg/ha de área plantada. Para a safra 2015/16 estima-se um aumento de produtividade, chegando a 3.087 kg/ha, gerando uma produção de mais de 100 milhões de toneladas do grão (Figura 2) (CONAB, 2016).

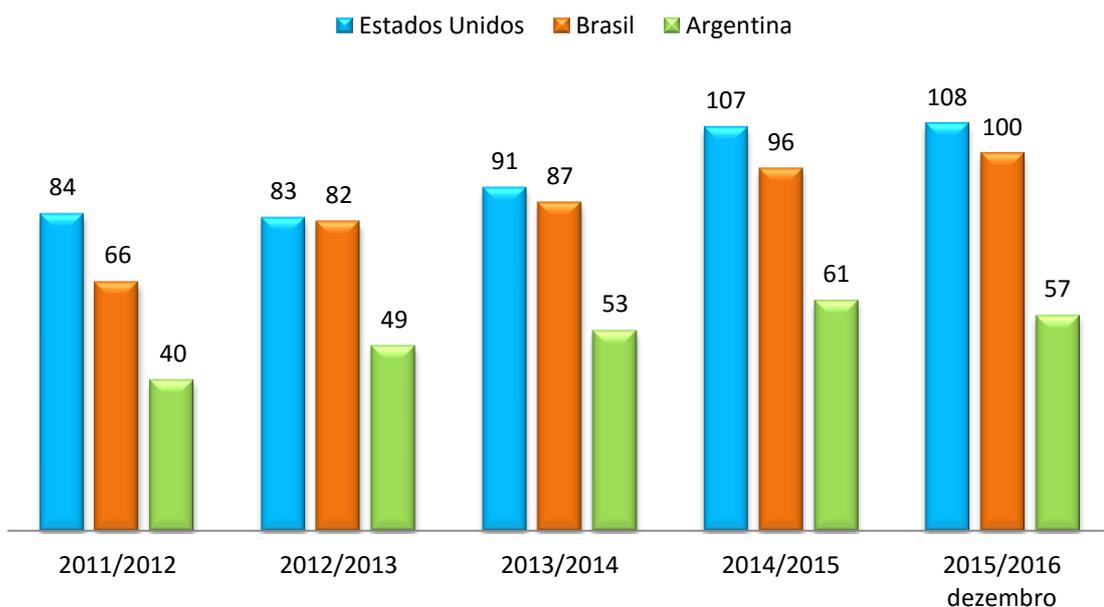
Figura 1- Mapa da produção agrícola de soja no Brasil.



Fonte: CONAB, 2016.

Atualmente, o complexo soja ocupa lugar de destaque entre os principais setores exportadores do agronegócio. O Brasil é autossuficiente na produção do grão, abastecendo o mercado interno e enviando o excedente ao mercado externo. Os grãos e farelo de soja brasileiros possuem alto teor de proteína e padrão de qualidade *premium*, o que permite sua entrada em mercados extremamente exigentes como os da União Europeia e do Japão (MAPA, 2016). Assim, as exportações de soja em 2015 foram de 54,32 milhões de toneladas, valor 19% maior que o do ano de 2014 e 30% maior que a média histórica. Para 2016 as exportações de soja em grãos são estimadas em 57,48 milhões de toneladas (CONAB, 2016).

Figura 2- Produção anual de soja dos principais produtores mundiais - em milhões de toneladas.



Fonte: CONAB, 2016.

2.3 CARACTERÍSTICAS NUTRICIONAIS DA SOJA E PRODUTOS DERIVADOS

O maior interesse comercial na produção de soja se dá pelo o alto teor de proteínas e óleos presentes no grão - aproximadamente 60% da composição total - como demonstrado na Tabela 1. Das proteínas provém os aminoácidos essenciais para a dieta humana, sendo as da soja consideradas completas, pois fornecem todos os aminoácidos que o ser humano não é capaz de sintetizar. Ainda, são

nutricionalmente equivalentes a proteína animal, podendo ser empregadas como única fonte proteica a curto e a longo prazo (CALLOU, 2009). O óleo de soja contém elevadas quantidades de ácidos graxos insaturados e ômega-3, considerados gorduras saudáveis, que estão pouco presentes nas dietas de muitas populações (HE & CHEN, 2013). Além disso, possuem componentes fisiologicamente benéficos, associados à diminuição dos níveis de colesterol total e lipoproteínas de baixa densidade no sangue (NISHINARI *et al.*, 2014).

A soja é um alimento bastante completo, destaca-se pelos benefícios à saúde que têm sido amplamente estudados e divulgados. Suas propriedades nutricionais e químicas a qualificam como funcional (BEHRENS & DA SILVA, 2004). Além de possuir quantidade considerável de proteínas, lipídios, carboidratos, minerais e vitaminas (Tabela 1), apresenta substâncias com funções estruturais e hormonais, principalmente fibras, carotenóides e flavonóides. Entre os flavonóides, as isoflavonas são as principais substâncias presentes na soja, sendo também a classe de compostos benéficos do grão mais extensivamente estudada até o momento (CALLOU, 2009).

Estudos recentes sugeriram que o consumo de soja e derivados parece estar relacionado com a diminuição do risco de reincidência ou mortalidade por câncer de mama (HE & CHEN, 2013), de doenças cardiovasculares (ZHANG *et al.*, 2003), osteoporose e sintomas da menopausa em mulheres (GENOVESE *et al.*, 2007; ROSTAGNO *et al.*, 2007). Além disso, está relacionado com a diminuição da pressão arterial (CHANG *et al.*, 2012), além de estar associado a efeitos antiinflamatórios e antioxidantes, protegendo o organismo contra danos causados por radicais livres (DURANTI, 2006).

Apesar de conhecidos seus benefícios à saúde, o consumo de soja é pouco difundido nos países ocidentais devido ao sabor indesejável, o *beany flavor* (sabor de feijão cru), gerado pela oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados por ação das enzimas lipoxigenases, presentes na soja. Entretanto, esse sabor pode ser eliminado pelo tratamento térmico dos grãos ou pelo desenvolvimento de novas culturas, que sejam livres das enzimas (BENASSI *et al.*, 2012; BEHRENS & DA SILVA, 2004). Devido a isso, diversos produtos derivados - com aprimoramento das características sensoriais - foram desenvolvidos para aumentar o consumo desses alimentos com propriedades funcionais. Estes produtos alimentícios, além de menos

calóricos, preservam as substâncias benéficas do produto tradicional (CALLOU, 2009).

Tabela 1 - Composição nutricional em 100 g de soja e bebidas à base de soja

Nutrientes	Soja	Bebidas à base de soja
Principais componentes		
Água (g)	8,54	75,82
Energia (kcal)	446	101
Proteínas (g)	36,49	4,22
Gorduras totais (g)	19,94	1,69
Cinzas (g)	4,87	0,97
Carboidratos (g)	30,16	17,3
Fibras (g)	9,3	1,3
Açúcares totais (g)	7,33	8,44
Minerais		
Calcio, Ca (mg)	277	127
Ferro, Fe (mg)	15,7	1,9
Magnésio, Mg (mg)	280	42
Fósforo, P (mg)	704	127
Potássio, K (mg)	1797	245
Sódio, Na (mg)	2	63
Zinco, Zn (mg)	4,89	1,9
Cobre, Cu (mg)	1,658	0,211
Manganês, Mn (mg)	2,517	14,768
Selênio, Se (µg)	17,8	7,4
Lipídios		
Ácidos graxos totais saturados (g)	2,884	0,422
Ácidos graxos totais monoinsaturados (g)	4,404	1,154
Ácidos graxos totais poliinsaturados (g)	11,255	0,057
Ácidos graxos totais trans (g)	0	0
Fitosterol (mg)	161	-

Fonte: USDA (2015)

2.4 BEBIDAS À BASE DE SOJA

O crescente interesse dos consumidores por alimentos que além da função básica de nutrir promovam efeitos benéficos à saúde tem aumentado o consumo das bebidas à base de soja. Inicialmente, o seu consumo no Ocidente se restringia

principalmente a pessoas com intolerância à lactose, vegetarianos e indivíduos com restrições alimentares. Entretanto, devido às novas tecnologias de produção, que possibilitam a obtenção de bebidas com melhores características sensoriais e da oferta constante de produtos com sabores diferenciados, essas bebidas têm sido difundidas entre toda a população (JAEKEL *et al.*, 2010). Além disso, o extrato de soja possui ampla aplicabilidade na indústria alimentícia, sendo utilizado como ingrediente em produtos lácteos, tais como iogurtes, formulados infantis, sorvetes e cremes, pois apresenta baixo custo e alto teor proteico (CALLOU, 2009).

O processo de produção das bebidas à base de soja é feito a partir do extrato de soja. Esse extrato é obtido por meio da moagem dos grãos de soja com água, processo no qual são preservadas as proteínas, parte dos carboidratos solúveis, gorduras insaturadas, vitaminas e minerais presentes no grão (CALLOU, 2009). A primeira etapa consiste na limpeza e seleção dos grãos, sendo um dos passos mais importantes para a produção de um extrato de qualidade, eliminando sabores e odores desagradáveis, além de reduzir a carga microbiana associada à presença de materiais estranhos. Após, os grãos são misturados com água quente e bicarbonato de sódio e bombeados a um moinho, onde há a conversão da soja em uma solução coloidal e sem atividade enzimática, composta por fibras e leite de soja e conhecida como *Slurry*. Posteriormente, o extrato é separado da fração fibrosa por meio de centrifugação e passa por processos de desodorização, padronização do teor proteico desejável, adição de ingredientes para a melhora de aceitabilidade da bebida, fortificação por adição de vitaminas e minerais, tratamento térmico para inativação de microrganismos e desodorização complementar e envase (FONTANA & BALESTRASSI, 2011; CALLOU, 2009).

Nutricionalmente, o extrato de soja apresenta 1,7% de lipídios, 4,2% de proteínas, 8,4% de açúcares (Tabela 1), podendo variar relativamente à composição da bebida, devido a adição de suco concentrado de fruta, além de outros aditivos capazes de melhorar o sabor e a aceitabilidade do produto, conseqüentemente (POTTER *et al.*, 2007). As características nutricionais e funcionais das bebidas à base de soja são responsáveis pelos mesmos benefícios à saúde oferecidos pelo grão. Algumas vitaminas presentes no extrato de soja possuem propriedades antioxidantes, neutralizando efeitos oxidantes dos lípidos por eliminação de radicais livres, que são potenciais causadores de diversas doenças (ANDRÉS *et al.*, 2014).

O extrato de soja é rico em proteínas de alta qualidade e não contém colesterol ou lactose (IÇIER *et al.*, 2015), sendo muitas vezes promovido como alternativa saudável ao leite bovino. Aliado a isso, é uma fonte de lecitina, isoflavonas e vitamina E e possui menos gordura saturada do que o leite de vaca. O teor de proteínas é praticamente igual, embora com diferente perfil de aminoácidos. O extrato hidrossolúvel de soja apresenta alta digestibilidade (95%) comparável à do leite de vaca (91%) e do leite humano (90%) (CARRÃO-PANIZZI & MANDARINO 1998). A maior desvantagem do extrato de soja em relação ao leite bovino é o teor de cálcio, o que é facilmente corrigido com adição de sais de cálcio durante a produção industrial da bebida (DASHPER *et al.*, 2012).

Fica evidente que as bebidas à base de soja representam uma alternativa de alimentação com diversos benefícios à saúde humana. Entretanto, devido ao seu processo de produção, além dos compostos saudáveis, podem conter resíduos de agrotóxicos utilizados na cultura da soja para controle de pragas. Esses resíduos são potencialmente tóxicos ao homem, podendo causar efeitos adversos aos sistemas nervoso central e periférico, ser cancerígenos ou imunodepressores (CALDAS & SOUZA, 2000). É importante salientar que atualmente não há legislação que estabeleça limites máximos de resíduos de agrotóxicos em bebidas à base de soja, dificultando assim o controle do uso indiscriminado desses compostos e preservação da saúde da população.

2.5 RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS

Agrotóxicos são produtos e agentes de processos químicos, físicos ou biológicos utilizados no cultivo, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, com a finalidade de preservá-las da ação de seres vivos nocivos (MAPA, 2015). Outros compostos utilizados para melhorar o desempenho da cultura da soja são os fitorreguladores ou reguladores de crescimento, utilizados para promover, inibir ou modificar o crescimento da planta, sendo análogos químicos de hormônios produzidos em baixas concentrações pela planta (DARIO *et al.*, 2005). O uso intensivo de agrotóxicos para o controle de pragas e doenças das lavouras existe a pouco mais de meio século, sendo esse crescente uso relacionado à presença de resíduos acima dos níveis autorizados nos alimentos. A presença de resíduos e

contaminantes é motivo de preocupação no âmbito da saúde pública, exigindo investimento e organização para implementar ações de controle, bem como o desenvolvimento de substâncias menos agressivas ao homem e ao meio ambiente (SOARES, 2010).

O crescente uso de agrotóxicos é associado a fatores de risco para a saúde humana, animal e ambiental. Os efeitos agudos de intoxicação aparecem durante ou após o contato com o agrotóxico, podendo ser divididos em efeitos muscarínicos (bradicardia, miose, espasmos intestinais e brônquicos, estimulação das glândulas salivares e lacrimais); nicotínicos (fibrilações musculares e convulsões) e centrais (sonolência, letargia, fadiga, cefaléia, perda de concentração, confusão mental e problemas cardiovasculares). Normalmente o diagnóstico da intoxicação crônica é difícil de ser estabelecido, sendo os danos muitas vezes irreversíveis, incluindo paralisias, vários tipos de câncer (SOARES, 2010; LONDRES, 2011). Diversas patologias graves como o câncer, doenças neurodegenerativas e distúrbios reprodutivos são suspeitos de estarem ligados à exposição a pesticidas (GOLD *et al.*, 2001; YARITA *et al.*, 2014; NOUGADÈRE *et al.*; 2014).

As culturas brasileiras com maior consumo de agrotóxicos são a soja, milho, citros e cana-de-açúcar (LOPES, 2006). Na última década, o uso de agrotóxicos no Brasil assumiu grandes proporções. Em 2008 o país alcançou a posição de maior consumidor mundial de agrotóxicos, com 986,5 mil toneladas de agrotóxicos aplicados (LONDRES, 2011). A cultura da soja atualmente é responsável por 56% do faturamento do setor de vendas de defensivos agrícolas, sendo a que mais demanda fungicidas. Em 2014, as vendas de agrotóxicos para o cultivo de soja foram equivalentes a 6,8 bilhões de dólares e o estado brasileiro que apresenta maior consumo é o Mato Grosso, seguido pelo Rio Grande do Sul, ambos produtores do grão de soja em larga escala (SINDIVEG, 2015).

Com o objetivo de evitar ou reduzir a ocorrência de intoxicações causadas por agrotóxicos, é realizado o monitoramento dos resíduos em alimentos e amostras às quais a exposição humana é passível, tendo como base os LMR estabelecidos por agências regulamentadoras em diversos países (SOLER *et al.*, 2005). Um dos fatores utilizados para estabelecer o LMR é a ingestão diária aceitável (IDA), quantidade de uma substância que pode ser ingerida diariamente, sem causar danos à saúde (PASCHOAL *et al.*, 2008).

Em 2001, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) criou o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), com o objetivo de avaliar e promover a qualidade dos alimentos em relação ao uso de agrotóxicos e afins (ANVISA, 2015). O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), com o mesmo objetivo, instituiu em 2008 o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), que monitora resíduos em diversas matrizes (MAPA, 2015).

O PARA avalia continuamente os resíduos de pesticidas nos alimentos de origem vegetal que chegam à mesa do consumidor. Entre as diversas matrizes avaliadas, a soja e produtos derivados não se fazem presentes, apesar do elevado consumo de agrotóxicos durante e pós-cultivo (ANVISA, 2015). O PNCRC estabelece limites máximos de resíduos para o grão de soja, entretanto, seu consumo não é muito difundido devido ao sabor indesejável (BEHRENS & DA SILVA, 2004). Assim, é de extrema importância que os subprodutos da soja também sejam monitorados quanto à presença de agrotóxicos, tendo em vista o elevado consumo e possibilidade de contaminação dos mesmos. Para garantia da segurança alimentar, o monitoramento da presença de resíduos em possíveis fontes de exposição humana deve ser feito através de métodos analíticos rápidos, seletivos e sensíveis.

2.6 TÉCNICAS DE PREPARO DE AMOSTRAS EMPREGADAS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS

O preparo de amostra é uma etapa crucial no processo analítico. Normalmente, é a etapa que demanda mais tempo e custos, sendo também a mais propensa a erros. A realização do preparo de amostras visa promover a extração e enriquecimento dos analitos de interesse quando necessário, além da remoção de componentes da matriz que podem causar interferência nos resultados. Essa etapa tem especial importância em análise de alimentos, que são matrizes complexas e possuem resíduos em níveis traço (WANG *et al.*, 2015).

O primeiro método multirresíduo para análise de agrotóxicos em alimentos foi desenvolvido na década de 60, utilizando acetonitrila para extração com posterior partição utilizando solventes apolares. Com o desenvolvimento de novos agrotóxicos, com características mais polares, fizeram-se necessárias novas

técnicas de extração, permitindo a determinação desses compostos (PRESTES *et al.*, 2009). Entretanto, essas técnicas são demoradas, complicadas, trabalhosas e envolvem muito custo, além da demanda de elevados volumes de solvente, que geram quantidades consideráveis de resíduos (WILKOWSKA & BIZIUK, 2011).

A partir dos anos 1990, foram desenvolvidas diversas técnicas alternativas de extração de compostos orgânicos, com o intuito de reduzir volumes de solventes utilizados e simplificar etapas. Entre essas, podemos destacar a extração em fase sólida (*solid phase extraction*, SPE), utilizada tanto como etapa de preparo quanto de purificação de extratos (PRESTES *et al.*, 2009). Outras novas técnicas desenvolvidas nesse período incluem dispersão da matriz em fase sólida (*matrix solid phase dispersion*, MSPD), microextração em fase sólida (*solid phase micro extraction*, SPME), extração sortiva em barra magnética (*stir bar sorptive extraction*, SBSE), extração por fluido supercrítico (*supercritical fluid extraction*, SFE), extração acelerada por solventes (*pressurized liquid extraction*, PLE) e extração assistida por micro-ondas (*microwave assisted extraction*, MAE) (GOLGE & KABAK, 2015). Esses métodos modernos de preparo de amostra geralmente são eficientes, mas demandam investimento em instrumentação, além de etapas de limpeza de equipamentos entre extrações e qualificação dos analistas, tornando-se caros e demorados. Outra desvantagem é a dificuldade de aplicação para análises multirresíduo, tendo em vista que essas técnicas são eficazes para uma gama limitada de compostos em determinadas condições (PRESTES *et al.*, 2009).

As dificuldades relacionadas à determinação de resíduos se encontram principalmente na variedade e complexidade de matrizes, além das baixas concentrações de analitos presentes nas amostras (HOU *et al.*, 2013). Essa determinação em matrizes complexas, com alto teor de gordura, açúcar e proteínas, requer atenção especial na etapa de preparo de amostra, pois é necessário que o extrato final da amostra contenha os analitos de interesse com o mínimo de co-extrativos que possam interferir na análise. Segundo Gilbert-López *et al.* (2009), melhores resultados de recuperação são obtidos em análises multirresíduos quando os extratos não possuem gordura. Portanto, além da etapa de extração, normalmente é feita uma ou mais etapas de limpeza do extrato, com o objetivo de remover co-extrativos, que além de interferir na análise, causando supressão ou aumento de sinal, podem danificar os sistemas de detecção (YUSA *et al.*, 2015).

Nos últimos anos, têm-se aplicado esforços para que a etapa de preparo de amostras seja feita de maneira que se consiga extrações multirresíduo eficientes, com minimalização de interferentes no extrato. Ao mesmo tempo, deseja-se que seja mais rápida, prática, demandando menos custos e com menor geração de resíduos. Em 2003, Anastassiades *et al.* propuseram um método multirresíduo moderno de preparo de amostras, objetivando desfazer essas limitações práticas relacionadas a técnicas prévias. O método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*) foi inicialmente proposto para extração de agrotóxicos em amostras de frutas e vegetais, tendo sido expandido para grande variedade de analitos e compostos (PRESTES *et al.*, 2009; GONZÁLEZ-CURBELO *et al.*, 2015).

2.6.1 Método QuEChERS

Essa técnica de preparo de amostra se baseia em três etapas principais: extração dos analitos, partição com adição de sais e limpeza de extrato empregando extração em fase sólida dispersiva (*dispersive solid phase extraction, d-SPE*) (BORGES *et al.*, 2015).

A etapa de extração utiliza acetonitrila como solvente, possibilitando a extração de uma ampla gama de compostos, com diferentes polaridades e o mínimo de interferentes que possam causar efeito matriz. Além das vantagens sobre outros solventes, como miscibilidade em água e melhor extração de compostos básicos quando comparada a acetato de etila, ou a separação de fases utilizando apenas sais, quando comparada a acetona, a acetonitrila quando acidificada permite recuperações satisfatórias de pesticidas que apresentam problemas de estabilidade pH dependente. Outra vantagem da utilização desse solvente é a compatibilidade com os sistemas de LC-MS/MS e GC-MS/MS (PRESTES *et al.*, 2009).

A etapa de partição por adição de sais promove o efeito *salting-out*, que se caracteriza pela separação de fases em solução aquosa de solventes orgânicos miscíveis em água, por adição de eletrólitos, devido ao deslocamento do equilíbrio de partição de solutos orgânicos. A adição de sais também acarreta a precipitação de proteínas e altera a solubilidade dos compostos, fazendo com que quase a totalidade dos analitos procurados estejam solúveis na fase orgânica (ENDO *et al.*, 2012). O efeito *salting-out* é possibilitado pela interação entre água e cloreto de sódio, ocorrendo solvatação de íons e impedindo que a água esteja livre para fazer

ligações com outras substâncias. Isso possibilita aumento de recuperação para analitos polares, pela diminuição da solubilidade desses compostos em fase aquosa, bem como a quantidade de água na fase orgânica. Além disso, utilizam-se sais secantes para reduzir o volume de fase aquosa e favorecer a extração dos analitos (BORGES *et al.*, 2015; PRESTES *et al.*, 2011).

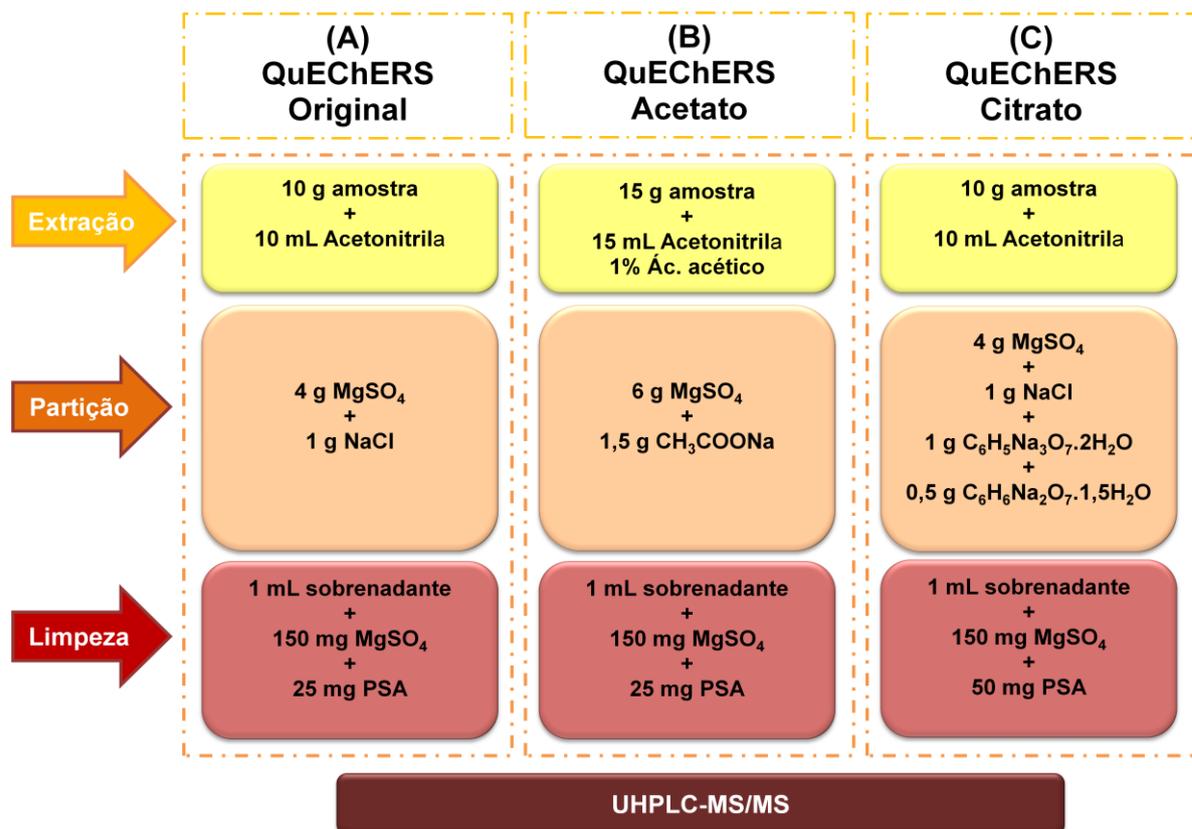
A primeira versão do método desenvolvida, denominada QuEChERS original (Figura 3a), apresenta bons resultados para diferentes tipos de amostras. Entretanto, a adição de uma etapa de tamponamento pode melhorar percentuais de recuperação para compostos que apresentam problemas de estabilidade dependendo do pH da matriz. Surgiram então as versões modificadas do método, utilizando tampões de acetato de sódio e mistura de citrato de sódio diidratado e hidrogenocitrato de sódio sesquihidratado. Foram chamadas de QuEChERS acetato (Figura 3b) e QuEChERS citrato (Figura 3c), sendo utilizados como métodos oficiais para determinação multirresíduo de agrotóxicos em alimentos (BORGES *et al.*, 2015; PRESTES *et al.*, 2011; GONZÁLEZ-CURBELO *et al.*, 2015).

A etapa de limpeza do extrato é feita para evitar que componentes da matriz interfiram nos resultados - causando supressão ou aumento de sinal analítico em análises por espectrometria de massas – e não danifiquem o sistema cromatográfico e o detector, diminuindo manutenções técnicas no equipamento e garantindo resultados mais confiáveis (BORGES *et al.*, 2015; MORRISON, *et al.*, 2016). Na d-SPE uma alíquota do extrato é adicionada a pequena quantidade de sorvente, o qual funciona como filtro químico, retendo co-extrativos da matriz. Como vantagem de utilizar a d-SPE, além da facilidade e uso de pequenas quantidades de sorventes quando comparado ao SPE convencional, pode-se combinar diferentes tipos de sorventes, de acordo com a necessidade de remoção de interferentes (BORGES *et al.*, 2015; PRESTES *et al.*, 2011).

A etapa de d-SPE utilizada no método QuEChERS original empregava amina primária-secundária (*primary secondary amine*, PSA) como sorvente e sulfato de magnésio para remoção de água residual. Devido à estrutura do PSA, a retenção de ácidos graxos livres e de outros compostos polares presentes na matriz é muito forte. Isso aliado à remoção de água, que permite um extrato final menos polar, facilitando a precipitação dos co-extrativos polares, proporciona limpeza efetiva dos extratos. Entretanto, a utilização de PSA como único sorvente de limpeza é ineficiente na retenção de alguns componentes da matriz, como pigmentos e

lipídeos. Faz-se o uso então de combinações de sorventes, utilizando carbono grafitizado (*grafitized carbon black*, GCB) para remoção de pigmentos e esteróis e C18 para remoção de gorduras (BORGES *et al.*, 2015; WILKOWSKA & BIZIUK, 2011; PRESTES *et al.*, 2011).

Figura 3 - Representação das etapas do método QuEChERS (A) original, (B) acetato, (C) citrato.



LI *et al.* (2013) aplicaram o método QuEChERS para extração de triazinas e feniluréias em amostras de leite e iogurte, utilizando cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos (LC-DAD). Os herbicidas foram extraídos por uma mistura de acetato de etila e n-hexano, utilizando cloreto de sódio como sal de partição e a limpeza dos extratos foi feita utilizando 10 mg por mL de PSA. Para melhorar a remoção de gordura, foi aplicada centrifugação a baixas temperaturas. O método demonstrou ser eficaz para extração dos herbicidas em matrizes complexas, alcançando recuperações de 78,9 a 99,9%.

RIZZETTI e colaboradores (2016) utilizaram o método QuEChERS tamponado com acetato de sódio e extração com acetonitrila acidificada para

determinação de 74 pesticidas em suco de laranja por UHPLC-MS/MS. A limpeza dos extratos foi feita com PSA. O método mostrou-se adequado para o objetivo proposto, com recuperações entre 70% e 118% e RSD menor que 19% para todos os compostos.

JEONG *et al.* (2012) determinaram resíduos de 14 agrotóxicos em leite por cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons (GC-ECD), aplicando QuEChERS tamponado com acetato de sódio, juntamente com sulfato de magnésio como secante e extração com acetonitrila acidificada. A limpeza dos extratos foi realizada utilizando mistura de PSA e C18. Nas condições otimizadas, foram alcançadas recuperações entre 91,6 a 99,7% para os compostos avaliados, demonstrando que o método foi eficiente para a extração e pode ser implantando em laboratórios de rotina, pela praticidade e baixo custo.

JOVANOVIĆ e colaboradores (2014) utilizaram QuEChERS citrato para extração de 7 inseticidas neonicotinóides em amostras de licor de mel por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série (*liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry*, LC-MS/MS). A limpeza dos extratos foi feita com PSA. Os resultados de recuperação variaram de 71,8 a 94,9% para os compostos estudados, demonstrando que o método foi considerado aplicável para as análises requeridas.

Fica evidente que o método QuEChERS apresenta praticidade e versatilidade, sendo estas as principais características que o tornam o método de escolha para análise multirresíduo de agrotóxicos em diversas matrizes, incluindo as bebidas à base de soja.

2.7 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS

As técnicas cromatográficas têm sido amplamente utilizadas na determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos ao longo dos anos, destacando-se pela possibilidade de análises qualitativas e quantitativas (PASCHOAL *et al.*, 2008). Entretanto, nas últimas décadas houveram mudanças significativas nos métodos de análise, principalmente devido à evolução da instrumentação analítica.

Desde a década de 70 a cromatografia gasosa é utilizada para análise de resíduos, sendo combinada a detectores clássicos, como captura de elétrons

(*electron capture detection*, ECD), nitrogênio e fósforo (*nitrogen and phosphorus detection*, NPD) e fotometria de chama (*flame photometric detection*, FPD) (ALDER *et al.*, 2006). Atualmente, faz-se o uso do acoplamento de cromatografia gasosa a detectores de espectrometria de massas (*gas chromatography coupled to mass spectrometry*, GC-MS) combinando as vantagens da separação cromatográfica à obtenção de informação estrutural e massa molar, além de aumento da seletividade na determinação (CHIARADIA *et al.*, 2008). A GC-MS é aplicável a compostos voláteis e termicamente estáveis às temperaturas empregadas durante a separação cromatográfica, sendo mais adequada para compostos apolares (YUSA *et al.*, 2015).

Devido ao desenvolvimento de agrotóxicos modernos, com características polares ou iônicas, que são menos persistentes e tóxicos ao meio ambiente, fez-se crescente a utilização da LC-MS/MS para determinação de resíduos (QUEIROZ *et al.*, 2012). LC-MS/MS é técnica mais adequada para compostos de elevada polaridade, pouco voláteis ou termicamente instáveis (YUSA *et al.*, 2015), sendo muito utilizada devido à elevada detectabilidade e seletividade oferecidas por esse acoplamento (FERNANDES *et al.*, 2011).

Entre os avanços recentes nas técnicas cromatográficas a líquido, está a UHPLC, que surgiu da necessidade em análises eficientes, demandando menos tempo. Os princípios de separação são os mesmos empregados em cromatografia líquida de alta eficiência (*high performance liquid chromatography*, HPLC). A principal diferença encontra-se no tamanho de partícula utilizado nas colunas e as dimensões das mesmas, além das altas velocidades lineares de fase móvel empregadas, reduzindo o tempo das análises e gerando ganho em detectabilidade e resolução dos picos (MALDANER & JARDIM, 2012). O acoplamento UHPLC-MS/MS tem sido utilizado com sucesso para análises de matrizes complexas, permitindo rapidez e resultados confiáveis (FERNANDES *et al.*, 2011).

2.7.1 Cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS)

Desde a sua introdução no mercado em 2004, a UHPLC tem sido destaque pelas melhorias que apresenta em relação à HPLC. Além da facilidade de transferência de métodos de HPLC para UHPLC, essa nova técnica permite reduzir o tempo de análise, mantendo a resolução e eficiência de separação e gerando

picos menos alargados, economia de fases móvel e estacionária, possibilidade de injeção de pequenos volumes de amostra e menos geração de resíduos (CIELECKA-PIONTEK *et al.*, 2013).

A UHPLC opera com colunas de tamanho reduzido (5-10 cm de comprimento e diâmetro interno de 1-2,1 mm), tendo o tamanho de partícula menor que 2 μm . Essas colunas, associadas à maior velocidade linear da fase móvel, permitem melhores separações em menor tempo. Entretanto, devido ao aumento da densidade de partículas no recheio da coluna, ocorre significativa elevação na pressão do sistema, necessitando de equipamentos aptos a operar em tais condições. Além disso, faz-se necessário um sistema de bombeamento robusto, injeção rápida, exata e precisa para pequenos volumes e detectores com alta taxa de aquisição de dados, como espectrômetros de massas (MALDANER & JARDIM, 2012). A combinação de UHPLC-MS/MS fornece vantagens significativas com relação à seletividade, detectabilidade e velocidade de análise (QUEIROZ *et al.*, 2012).

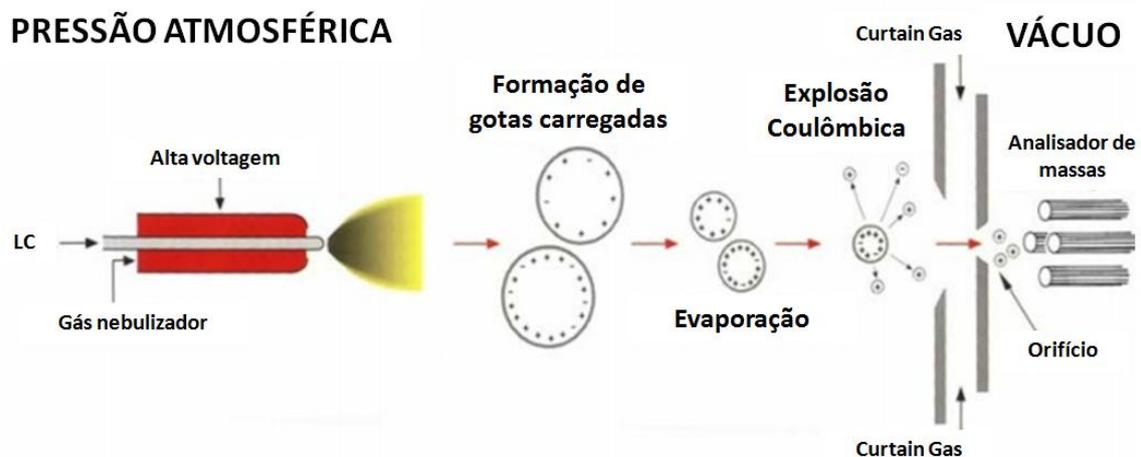
O espectrômetro de massas é composto por três unidades fundamentais: uma fonte de íons, um analisador de massas e um sistema de detecção (LANÇAS, 2009). A fonte de ionização gera os íons que serão analisados na fase gasosa. O analisador de massas separa os íons gerados na fonte de acordo com as suas razões massa/carga (m/z), empregando combinações entre campos elétricos e magnéticos. O detector, por fim, quantifica os íons provenientes do analisador de massas (MARTINS, 2005).

As fontes de ionização mais utilizadas no acoplamento LC-MS são *electrospray* (*electrospray ionization*, ESI), ionização química à pressão atmosférica (*atmospheric pressure chemical ionization*, APCI) e ionização por fótons à pressão atmosférica (*atmospheric pressure photon ionization*, APPI). A ESI é empregada na análise de moléculas de elevadas massas moleculares e de maior polaridade, já a APCI é utilizada para moléculas menores e menos polares (LANÇAS, 2009). Será dado enfoque à fonte de ionização ESI, por ter sido utilizada no desenvolvimento desse trabalho.

Em ESI (Figura 4), os íons são formados sob pressão atmosférica, sendo a solução de amostra pressurizada em um tubo capilar, ao qual é aplicada uma alta voltagem (entre 3.000 e 5.000 V). Na saída do capilar são formadas pequenas gotas altamente carregadas, na forma de um aerossol. Essas gotículas são dessolvatadas

com auxílio de um gás (geralmente N_2) e os íons fluem para o espectrômetro de massas, induzidos pelos efeitos das atrações eletrostáticas e pela pressão reduzida (CHIARADIA *et al.*, 2008; LANÇAS, 2009). À medida que as moléculas são dessolvatadas, o tamanho das gotas diminui, até que a força de repulsão entre as cargas seja maior que as forças de coesão da fase líquida. Ocorre então um fenômeno denominado “explosão coulômbica”, a partir do qual são formadas gotículas menores. Com a ocorrência de sucessivas explosões, são produzidos íons do analito na fase gasosa, os quais são focalizados para o interior do espectrômetro de massas. Nesse tipo de ionização, ocorre a geração de espécies carregadas dos analitos com pequena ou nenhuma fragmentação da molécula a ser analisada. Além disso, devido ao modo como os íons são gerados, é facilmente aplicável a compostos ionizáveis em solução e compostos altamente polares, que podem ser facilmente ionizados (CHIARADIA *et al.*, 2008).

Figura 4 - Esquema da fonte de ionização ESI.

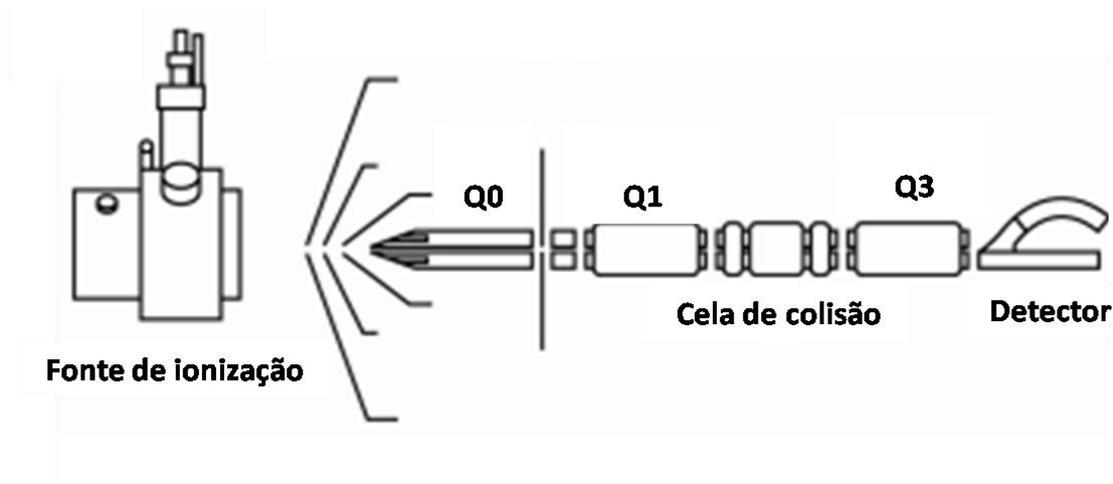


Fonte: Adaptado de AB SCIEX, 2006

Os analisadores de massas quadrupolares consistem de quatro eletrodos cilíndricos metálicos, dispostos paralelamente. Os eletrodos opostos são conectados a geradores de radio frequência (RF) e corrente direta (DC), que variam em magnitude, produzindo um campo elétrico e de rádio frequência combinados durante a passagem dos íons pelo quadrupolo. Em um valor específico de voltagem, a ação do campo quadrupolar faz com que os íons oscilem e que apenas íons de uma determinada razão m/z atravessem o quadrupolo descrevendo uma trajetória estável. Um sistema triploquadrupolo é composto por três analisadores

quadrupolares dispostos em série (Figura 5), onde o primeiro e o terceiro quadrupolos (Q1 e Q3) funcionam como filtro de massas e o segundo (Q2) opera como cela de colisão. Em Q1, os íons de interesse são separados e encaminhados para Q2, onde ocorrem reações de dissociação desses íons. Em Q3, os fragmentos selecionados são separados de acordo com suas razões m/z e focalizados ao detector (MARTINS, 2005; CHIARADIA *et al.*, 2008).

Figura 5 - Esquema de analisador de massas triploquadrupolo.



Fonte: Adaptado de AB SCIEX 2010

O modo de operação empregado nesse trabalho é o monitoramento de reações selecionadas (*selected reaction monitoring*, SRM), onde se monitora a fragmentação de vários íons precursores e seus respectivos íons produto de m/z específica (MARTINS, 2005; CHIARADIA *et al.*, 2008). Este modo é ideal para aplicações quantitativas, às quais requerem alta sensibilidade e seletividade.

2.8 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS

Atualmente, os métodos empregados para análise de resíduos e contaminantes permitem a obtenção de grande quantidade de dados e informações, devido a modernidade de automação e rapidez nas respostas analíticas. Nesse contexto, faz-se necessário o uso de ferramentas estatísticas, que auxiliam na exploração e entendimento da gama crescente de dados gerados (PEREIRA-FILHO *et al.*, 2002). O planejamento ou delineamento experimental representa um conjunto

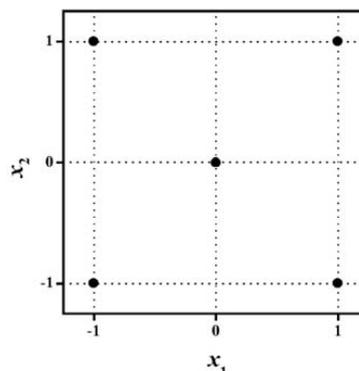
de ensaios com critérios científicos e estatísticos, objetivando determinar a influência de variáveis nos resultados de um dado processo (TEÓFILO & FERREIRA, 2006).

O objetivo da aplicação destas ferramentas estatísticas é a otimização do procedimento. Geralmente, é realizada por meio de processos que avaliam o efeito de uma variável por vez (univariado), tendo como desvantagens o tempo gasto e a falta de avaliação das interações entre as variáveis que afetam o procedimento. Devido a isso, há destaque para as ferramentas de planejamento fatorial, que permitem avaliar simultaneamente o efeito de um grande número de variáveis, a partir de um número reduzido de ensaios experimentais (CUNICO *et al.*, 2008).

O planejamento fatorial é uma ferramenta estatística importante e simples, e para seu entendimento, é necessário conhecer alguns conceitos básicos. O fator é definido como cada variável do sistema. Os níveis são as condições de operação dos fatores investigadas nos experimentos. Efeito é a mudança ocorrida na resposta quando se modificam os níveis. O planejamento fatorial é o mais indicado quando se deseja estudar os efeitos de duas ou mais variáveis de influência, sendo que em cada réplica, todas as combinações possíveis dos níveis de cada variável são investigadas. Normalmente, esse tipo de planejamento é representado por b^k , sendo k o número de fatores e b o número de níveis escolhidos (CUNICO *et al.*, 2008).

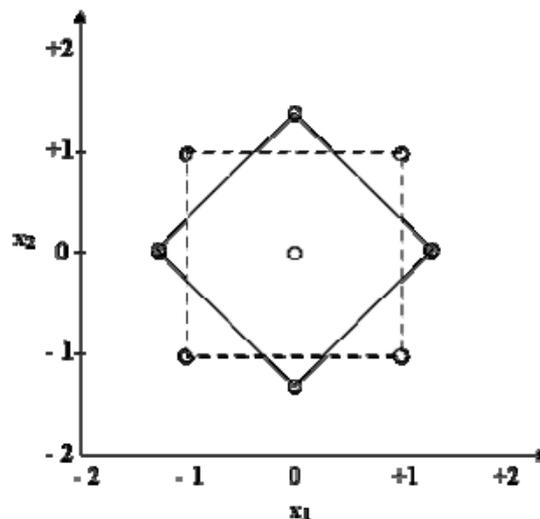
Para obtenção de boa estimativa dos erros, utilizam-se planejamentos fatoriais com ponto central, onde um experimento é incluído no centro do planejamento (Figura 6), no qual o valor médio dos níveis de todas as variáveis é empregado. Esse tipo de planejamento varre três níveis de cada fator, permitindo assim, verificar se há ou não falta de ajuste para um modelo linear (TEÓFILO & FERREIRA, 2006; CUNICO *et al.*, 2008).

Figura 6 - Planejamento fatorial de dois níveis com ponto central (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).



O planejamento em estrela (Figura 7) consiste em acrescentar ao planejamento inicial (linear) um planejamento idêntico, porém girado de 45° em relação à orientação de partida. O resultado é uma distribuição octogonal conforme a Figura 6 (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

Figura 7 - Planejamento fatorial em estrela para duas variáveis codificadas (adaptado de NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).



As réplicas de experimentos servem para determinar o erro experimental na resposta em estudo e a reprodutibilidade do experimento utilizado, sendo de fundamental importância para a veracidade dos resultados obtidos. A partir das repetições realizadas é possível obter a média e a variância das replicatas (TEÓFILO & FERREIRA, 2006; CUNICO *et al.*, 2008).

A metodologia de superfícies de resposta (*response surface methodology*, RSM) é uma ferramenta de otimização baseada em planejamentos fatoriais que tem sido utilizada com grande sucesso na modelagem de diversos processos (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010). A RSM descreve o modo como as variáveis influenciam na resposta, à medida que ilustra informações sobre o comportamento das variáveis na região estudada. Apresenta duas etapas distintas, modelagem e deslocamento, as quais são repetidas tantas vezes quanto necessário, com o objetivo de atingir uma região ótima da superfície investigada. A modelagem é normalmente feita ajustando-se modelos simples (em geral, lineares ou quadráticos) a respostas obtidas com planejamentos fatoriais ou planejamentos fatoriais

ampliados. O deslocamento se dá sempre ao longo do caminho de máxima inclinação de um determinado modelo, que é a trajetória na qual a resposta varia de forma mais pronunciada (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

2.9 PADRÃO INTERNO E PADRÃO DE CONTROLE

As análises instrumentais estão sujeitas à ocorrência de variações nos resultados obtidos, causadas por pequenas oscilações do sistema. Como meio de verificar e corrigir ou minimizar tais variações, utiliza-se um padrão de concentração conhecida, denominado padrão interno (PI). Esse padrão deve ser similar às substâncias quantificadas, não interagir com as mesmas ou outros componentes da matriz, não estar contido na amostra e não coeluir com os analitos em estudo. Através da análise da área do padrão pode-se verificar a ocorrência de variações significativas na resposta do instrumento durante as análises (RIBANI *et al.*, 2004).

O padrão de controle (PC), também conhecido como padrão de substituição, *surrogate* ou adição é um padrão adicionado à amostra antes da extração dos analitos. O ideal é a utilização de compostos isotopicamente modificados, pois não são encontrados na natureza nesta forma e são quimicamente idênticos aos analitos não deuterados (RIBANI *et al.*, 2004). O padrão de controle serve para avaliar possíveis perdas de analito durante a extração, corrigindo as variações nos resultados durante as etapas de diluição, evaporação e injeção da amostra (SANCO, 2013).

Os padrões utilizados como padrão interno e padrão de controle servem para acompanhamento da eficiência do método analítico, avaliando possíveis perdas na etapa de extração e a ocorrência de variações no sistema cromatográfico.

2.10 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS

Um método analítico desenvolvido necessita um processo de avaliação que garanta sua eficiência e bom desempenho na rotina do laboratório. Esse processo é denominado validação. Determinado método é considerado validado se suas características estiverem de acordo com pré-requisitos estabelecidos (BRITO *et al.*,

2003). Assim, utilizando métodos validados pode-se fornecer resultados que ajudam a monitorar a qualidade dos alimentos.

No Brasil, os dois órgãos que regulamentam a validação de métodos analíticos são a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que publicou em 2003, o “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos” e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental (INMETRO), que em 2003, publicou um documento com orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos.

Em 2014, passou a vigorar a guia SANCO (2013) de controle de qualidade analítica e procedimentos de validação para análise de resíduos de pesticidas em alimentos, que descreve as exigências para a validação de metodologias analíticas. Esse guia tem como principais objetivos a uniformização dos sistemas de controle de qualidade, a garantia da qualidade e a comparabilidade de resultados, estabelecimento de exatidão aceitável, evitar o fornecimento de falsos resultados e servir de apoio ao sistema ISO/IEC 17025:2005.

A validação é feita através do estabelecimento de limites de alguns parâmetros, por meio da estimativa das figuras de mérito, que são indicadores quantitativos do escopo e do bom desempenho das técnicas (RIBEIRO *et al.*, 2008). Alguns dos parâmetros avaliados durante a etapa de validação estão representados na Tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros avaliados durante a etapa de validação de métodos analíticos.

Parâmetro	Referência	Definição	Aplicação
Seletividade	INMETRO	Capacidade de detecção de substâncias distintas	Extração de matriz "branco"
Especificidade	ANVISA	Capacidade de detecção do analito na presença de interferentes	<i>versus</i> matriz branco fortificada
	SANCO		
Linearidade	INMETRO ANVISA	Correlação entre resposta analítica e concentração do analito	Curva Analítica ($y = ax + b$)
Faixa Linear de trabalho	INMETRO ANVISA	Intervalo de concentrações em que y e x correlacionam-se linearmente	Curva Analítica ($y = ax + b$)
Efeito Matriz	SANCO	Influência dos componentes da matriz na resposta	Comparação entre curvas preparadas em solvente e em extrato branco
Limite de detecção	INMETRO ANVISA	Concentração limite de distinção entre analito e ruído	S/R = 3
Limite de quantificação			S/R = 10
Precisão	INMETRO ANVISA	Proximidade de resultados obtidos por diferentes amostragens	Repetitividade e precisão intermediária
Exatidão	INMETRO ANVISA	Proximidade de resultado em relação à uma referência	Uso de material de referência certificado e ensaios de fortificação

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho proposto consistiu no desenvolvimento e validação de método de preparo de amostra QuEChERS visando a determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de bebidas à base de soja, empregando a técnica UHPLC-MS/MS para quantificação.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP) do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho estão listados abaixo:

- ✓ Centrífuga refrigerada NT 825 (Novatecnica, Brasil);
- ✓ Centrífuga 80-2B (Centribio, Brasil);
- ✓ Agitador Vortex - Biomixer Modelo QL-901 (Microtécnica, Brasil);
- ✓ Balança analítica de precisão AUW-220D (Shimadzu, Japão);
- ✓ Balança analítica de precisão UX-420H (Shimadzu, Japão);
- ✓ Concentrador e evaporador TurboVap® LV (Biotage, EUA)
- ✓ Micropepitadores automáticos com capacidade variável (Brand, Alemanha; Eppendorf, Canadá);
- ✓ Sistema UHPLC-MS/MS, modelo Xevo TQ (Waters, EUA), equipado com:
 - Cromatógrafo a líquido Waters (EUA);
 - Amostrador automático sample manager (Acquity);
 - Fonte de ionização por eletronebulização (EUA);
 - Detector MS do tipo triploquadropolo, modelo Xevo TQ (EUA);
 - Sistema de aquisição de dados MassLynx V 4.1 (EUA);
 - Coluna analítica ACQUITY UPLC BEH C18 (1,7 µm x 2,1 x 50 mm) Waters (EUA);
 - Sistema gerador de nitrogênio, PEAK NM30L-MS (Peak Scientific, Escócia).

3.2 MATERIAL, REAGENTES E SOLVENTES

- ✓ Acetonitrila grau HPLC (J. T. Baker, EUA);
- ✓ Ácido acético glacial, grau HPLC (J. T. Baker, EUA);
- ✓ Água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q Direct UV3R (resistividade de 18,2 MΩ cm);
- ✓ Metanol, grau HPLC (J. T. Baker, EUA);
- ✓ Formiato de amônio (Sigma Aldrich, EUA);
- ✓ Tubos de polipropileno, com tampas de rosca com capacidade de 50 e 15 mL (Sarstedt, Alemanha);
- ✓ Gás argônio 6.0 usado como gás de colisão no sistema UHPLC-MS/MS.
- ✓ Sulfato de magnésio anidro p.a. (J.T. Baker, Japão);
- ✓ Cloreto de sódio p.a. (Sigma-Aldrich, Alemanha);
- ✓ Acetato de sódio anidro (J.T. Baker, EUA);
- ✓ Citrato de sódio diidratado (Sigma-Aldrich, EUA);
- ✓ Hidrogenocitrato de sódio sesquidratado (Sigma-Aldrich, EUA);
- ✓ Sorvente Bondesil C18 com d.p. de 40 μm (Agilent, EUA);
- ✓ Sorvente Bondesil PSA com d.p. de 40 μm (Agilent, EUA);
- ✓ Sorvente Florisil[®] (Mallinckrodt, Irlanda);
- ✓ Acetona grau HPLC (J. T. Baker, EUA);
- ✓ Hexano (95% n-hexano) (J.T. Baker, EUA);
- ✓ Filtros de nylon de 13 mm e porosidade de 0,2 μm (Analítica, Brasil);
- ✓ Frascos de vidro (vial), capacidade de 2 mL (Agilent, EUA);
- ✓ Tubos eppendorf, capacidade de 2 mL (Eppendorf, Brasil);
- ✓ Extran[®] neutro e alcalino (Merck, Brasil);
- ✓ Padrões sólidos dos agrotóxicos em estudo (Tabela 3) (Dr. Erhenstorfer, Darmstadt; Alemanha)
- ✓ Vidraria comum de laboratório.

3.3 ESCOLHA DOS COMPOSTOS

Os agrotóxicos selecionados para o método desenvolvido foram escolhidos, primeiramente, a partir das monografias de agrotóxicos autorizados, estabelecidas

pela ANVISA, que relacionam os compostos e as devidas culturas para as quais encontram-se autorizados, com seus respectivos LMR. Os compostos escolhidos foram aqueles autorizados para a cultura de soja. Posteriormente, foram pesquisados os agrotóxicos mais indicados para a cultura, conforme material disponibilizado pela EMBRAPA para a cultura de soja (EMBRAPA, 2013). Portanto, os compostos selecionados para o método foram aqueles autorizados pela ANVISA, recomendados pela EMBRAPA e com disponibilidade no laboratório.

3.4 ESCOLHA DO PADRÃO INTERNO E DO PADRÃO DE CONTROLE

Os padrões escolhidos como padrão interno e de controle possuem apenas a finalidade de acompanhamento, não sendo utilizados para cálculos. Como padrão interno para a avaliação e controle do instrumento, foi escolhido o trifenilfosfato, tendo como base o trabalho desenvolvido por ANASTASSIADES *et al.* (2003) para análises utilizando QuEChERS. Foram aceitos valores de 20% de variação de área. No extrato final (1 mL) foi adicionado 10 µL de solução de trifenilfosfato na concentração de 10 mg L⁻¹.

Como padrão de controle, foi escolhida a atrazina-d5, com finalidade de avaliação do método de extração, não sendo utilizada para correção de recuperação dos analitos. Para todas as amostras de bebidas à base de soja (10 mL) foram adicionados 50 µL do padrão de controle na concentração de 10 mg L⁻¹.

3.5 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS

Foram preparadas soluções estoque individuais na concentração 1000 mg L⁻¹ dos agrotóxicos em estudo, levando em consideração a pureza dos padrões sólidos. Os compostos estão listados na Tabela 3, juntamente com a pureza do padrão sólido, classe, grupo químico e LMR. As fórmulas estruturais dos compostos estudados estão apresentadas no Anexo 1. A partir das soluções individuais, preparou-se uma mistura na concentração 10 mg L⁻¹. A partir desta, foi preparada a solução da mistura de padrões na concentração 1 mg L⁻¹, e então as soluções de trabalho na faixa de concentrações de 2,5; 5; 25; 50; 100 e 250 µg L⁻¹ em solvente

(acetonitrila) e no extrato da matriz (leite de soja), para injeção no sistema UHPLC-MS/MS.

O padrão controle (atrazina-d5) e o padrão interno (trifenilfosfato) foram preparados individualmente na concentração 10 mg L⁻¹.

As soluções estoque e posteriores diluições foram armazenadas em frascos âmbar a temperatura menor que - 4 °C.

Tabela 3 - Informações sobre os agrotóxicos estudados e Limites Máximos de Resíduos* para grãos de soja.

(continua)

Composto	Pureza (%)	Classe	Grupo químico	LMR (mg kg⁻¹)
Ácido Giberélico	98,5	Regulador de crescimento	Giberelina	-
Alacloro	99,5	Herbicida	Cloroacetanilida	0,05
Azoxistrobina	99	Fungicida	Estrobilurina	0,5
Ácido 4-indol-3-ilbutírico	98	Regulador de crescimento	Ácido indolalcanóico	-
Bentazona	98	Herbicida	Benzotiadinona	0,02
Cianazina	99	Herbicida	Triazina	0,02
Clorpirifós	97	Inseticida	Organofosforado	0,01
Carbendazim	99	Fungicida	Benzimidazol	0,5
Clorimurom	97	Herbicida	Sulfoniluréia	0,05
Cletodim	50	Herbicida	Oxima ciclohexanodiona	1
Clomazone	95,5	Herbicida	Isoxazolidinona	0,05
Ciproconazol	99	Fungicida	Triazol	0,05
Clorfluazurom	99	Inseticida	Benzoiluréia	0,05
Clorantraniliprole	94,5	Inseticida	Antranilamida	0,2
Diflubenzurom	99,4	Inseticida	Benzoiluréia	0,2
Difenoconazol	99	Fungicida	Triazol	0,05
Diclosulam	98,5	Herbicida	Sulfonilida triazolopirimidina	0,02
Dimetenamida-P	97,5	Herbicida	cloroacetamida	0,01
Etofenprox	98	Inseticida	Éter difenílico	1
Epoconazol	99	Fungicida	Triazol	0,05
Fluasifope-P	97	Herbicida	Ácido ariloxifenoxipropiônico	0,3
Fenoxaprope-P	99	Herbicida	Ácido ariloxifenoxipropiônico	0,02
Flutriafol	99,5	Fungicida	Triazol	0,1
Fluquinconazol	98,5	Fungicida	Triazol	0,05

Composto	Pureza (%)	Classe	Grupo químico	LMR (mg kg⁻¹)
Imazaquim	99,5	Herbicida	Imidazolinona	0,05
Imazetapir	99	Herbicida	Imidazolinona	0,1
Metolacloro	97	Herbicida	Cloroacetanilida	0,02
Metribuzim	99,8	Herbicida	Triazinona	0,1
Miclobutanil	99,5	Fungicida	Triazol	0,02
Metconazol	98	Fungicida	Triazol	0,05
Pendimetalina	98,8	Herbicida	Dinitroanilina	0,1
Propiconazol	97,5	Fungicida	Triazol	0,05
Procimidona	98	Fungicida	Dicarboximida	0,1
Piraclostrobina	97,5	Fungicida	Estrobilurina	0,1
Picoxistrobina	98,5	Fungicida	Estrobilurina	0,02
Quizalofope-P	95,5	Herbicida	Ácido ariloxifenoxipropiônico	0,05
Sulfentrazone	98,3	Herbicida	Triazolona	0,01
Tiofanato-metílico	99	Fungicida	Benzimidazol	0,5
Tebuconazol	98	Fungicida	Triazol	0,1
Tetraconazol	97,5	Fungicida	Triazol	0,1
Trifloxistrobina	99	Fungicida	Estrobilurina	0,02

*LMR estabelecidos pela ANVISA

3.6 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE DETERMINAÇÃO POR UHPLC-MS/MS

Os parâmetros utilizados no espectrômetro de massas foram previamente otimizados no laboratório.

A primeira etapa após a escolha dos compostos é a otimização do método. Fez-se o uso da biblioteca “*Quanpedia*” do UHPLC-MS/MS, onde constam os compostos com seus respectivos íons precursores e produtos, energias aplicadas no cone e colisão. Portanto, as informações relativas aos compostos foram retiradas deste banco de dados.

Para verificação de intensidade do sinal e tempos de retenção dos compostos, foi injetada solução de mistura dos agrotóxicos, na concentração $25 \mu\text{g L}^{-1}$, preparada em solvente acetonitrila (ACN).

A fase móvel (FM) foi previamente otimizada no laboratório para análise multirresíduo de agrotóxicos, utilizando os aditivos ácido fórmico e formiato de amônio, devido a alguns compostos da biblioteca “*Quanpedia*” terem sido previamente infundidos com a adição destes aditivos. Os testes realizados mostraram que a FM mais eficaz utiliza os dois aditivos, sendo a fase aquosa A 98% de água e 2% metanol e a fase orgânica B metanol, ambas contendo 0,1% de ácido fórmico e 5 mol L^{-1} de formiato de amônio.

A curva analítica foi preparada a partir da solução de mistura dos agrotóxicos no extrato da matriz, nas concentrações 2,5; 5; 25; 50; 100 e $250 \mu\text{g L}^{-1}$, sendo posteriormente diluída 5 vezes em água ultra-pura.

Foram avaliadas as transições escolhidas para quantificação e confirmação dos compostos em estudo. A transição de maior intensidade foi escolhida para quantificação do analito e a de segunda maior intensidade foi utilizada para confirmação do mesmo.

3.7 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM BEBIDAS À BASE DE SOJA POR UHPLC-MS/MS

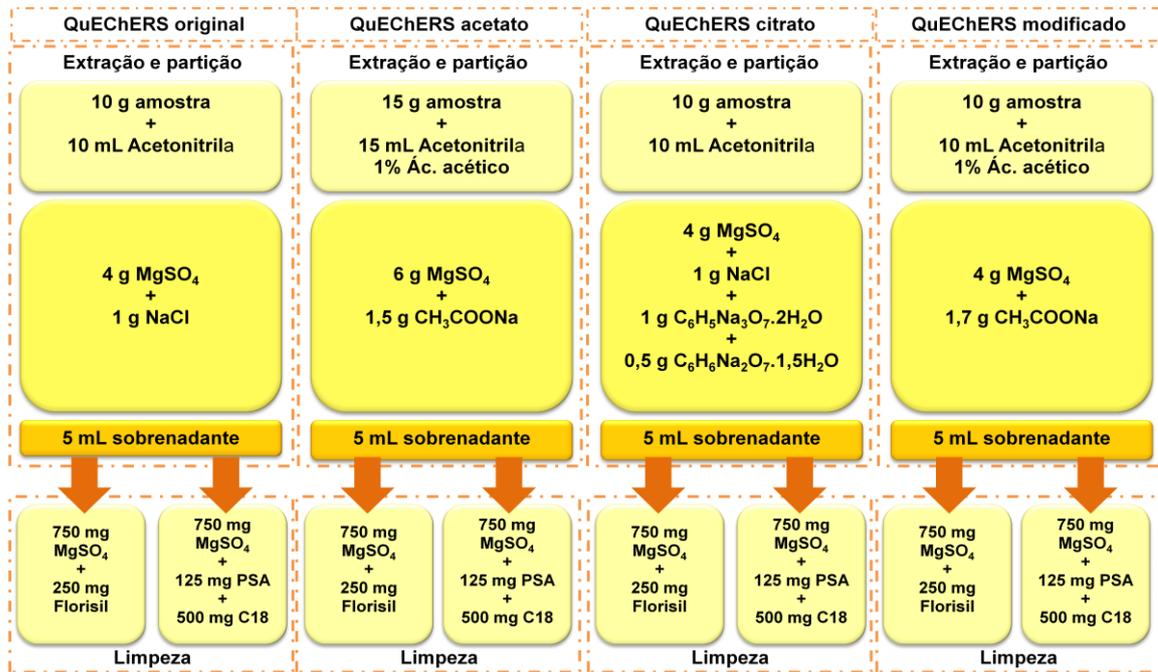
Como testes iniciais, foram propostos diferentes ensaios de extração e limpeza baseados no QuEChERS original (ANASTASSIADES *et al.*, 2003) e suas versões tamponadas citrato (CEN/TC 275, 2008) e acetato (LEHOTAY *et al.*, 2005).

Os testes visavam a avaliação da limpeza dos extratos por testes gravimétricos e recuperação dos compostos em triplicata no nível de $25 \mu\text{g L}^{-1}$ empregando os procedimentos de preparo de amostra ilustrados na Figura 3, com agitação de 1 min entre as etapas de extração com solvente, adição de sais e limpeza de extrato. Além disso, imediatamente após a adição de sais, os tubos foram centrifugados por 8 min a 3400 rpm e após a limpeza do extrato, durante 8 min a 3500 rpm.

3.7.1 Teste gravimétrico

Para avaliação inicial da limpeza dos extratos, foram realizados testes gravimétricos após a utilização de diferentes sorventes empregados na etapa de limpeza. Após extração utilizando QuEChERS, os extratos foram submetidos a diferentes etapas de limpeza. Após estas etapas, 2 mL de cada extrato limpo passou por um processo de secagem utilizando concentrador TurboVap®, sob fluxo de nitrogênio, utilizando temperatura de $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$, aproximadamente. Os tubos de vidro contendo os resíduos foram então pesados para avaliação da remoção de co-extrativos, tendo como base a diferença das massas dos tubos antes e após a secagem dos extratos. A Figura 8 representa os procedimentos de limpeza empregados nesse ensaio.

Figura 8 – Procedimentos de extração e limpeza empregados para otimização do método e para o teste gravimétrico.



3.7.2 Planejamento Fatorial 2²

Com a escolha do melhor método de extração baseado na recuperação de compostos e melhor etapa de limpeza baseada no teste gravimétrico, realizou-se um planejamento fatorial com duas variáveis, a fim de otimizar o processo de limpeza dos extratos. De acordo com o teste gravimétrico, a utilização de C18 e PSA removeu mais co-extrativos da matriz, restando menos resíduos no tubo. Portanto, foram testadas variações nas quantidades dos sorventes para avaliar a influência na recuperação dos agrotóxicos em estudo.

Aplicou-se um planejamento fatorial 2², com uso de repetição em duplicata do ponto central e extrapolação dos níveis das variáveis. Assim, conforme Tabela 4 a etapa de planejamento experimental consistiu na avaliação do uso de dois sorventes (C18 e PSA) associados a sulfato de magnésio anidro para a limpeza de 5 mL de extrato, com a geração de 10 ensaios, feitos em triplicata. Realizou-se teste gravimétrico para avaliação da limpeza e testes de recuperação dos compostos no nível de 25 µg L⁻¹.

Tabela 4 - Condições dos ensaios realizados no planejamento experimental para otimização das condições de limpeza.

Ensaio	C18 (mg)	PSA (mg)
1	125	25
2	125	125
3	500	25
4	500	125
5	0	60
6	600	60
7	240	0
8	240	150
9	240	60
10	240	60

3.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM BEBIDAS À BASE DE SOJA POR UHPLC-MS/MS

O método QuEChERS proposto neste trabalho visando a determinação de resíduos de agrotóxicos em bebidas à base de soja foi validado conforme os parâmetros já descritos de seletividade, curva analítica e faixa linear, limites de detecção e quantificação, exatidão através de ensaio de recuperação, precisão (repetitividade) e precisão intermediária (reprodutibilidade), além da avaliação do efeito matriz.

A extração dos compostos foi feita utilizando QuEChERS citrato e a etapa de limpeza foi realizada com sulfato de magnésio anidro e C18, em acordo com os resultados preliminares obtidos e planejamento experimental.

3.8.1 Seletividade

O teste para avaliação da seletividade foi realizado a partir da comparação dos cromatogramas obtidos da injeção no sistema UHPLC-MS/MS de amostra branco e de amostra branco fortificada com os padrões analisados pelo método.

3.8.2 Curva analítica e faixa de trabalho

Para verificar a faixa de trabalho e o comportamento da resposta analítica foram preparadas curvas analíticas de cada analito. A faixa de concentração avaliada foi de 2,5 a 250 $\mu\text{g L}^{-1}$. Foram analisadas as curvas obtidas através da injeção de soluções padrão em solvente e no extrato da matriz. A partir das respostas, avaliou-se o coeficiente de determinação (r^2) e o modelo de calibração mais adequado para cada composto. Os dados de regressão foram obtidos com auxílio do *software* (MassLynx V 4.1) do equipamento.

3.8.3 Efeito Matriz

A determinação do efeito matriz (EM) pode ser feita com base na comparação das inclinações das curvas analíticas dos compostos, com as mesmas concentrações, em solvente e na matriz (FERRER *et al.*, 2011), com pontos de mesmas concentrações aos aplicados para avaliação da faixa de trabalho. Para estimar esse efeito, realiza-se a comparação entre os coeficientes angulares das equações de reta obtidas, através do cálculo demonstrado na Equação 1.

$$\text{Efeito}_{\text{Matriz}} = \frac{X_1 - X_2}{X_2} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

X_1 = média das inclinações da curva preparada no extrato da matriz;

X_2 = média das inclinações da curva preparada em solvente.

Através deste cálculo, verifica-se se a relação do efeito de interferentes da matriz sobre o sinal analítico é positivo (aumento de sinal) ou negativo (decréscimo de sinal). Considera-se que o efeito matriz exerce influência no desempenho analítico quando o resultado for superior a 20% (FERRER *et al.*, 2011). Nesse caso, a quantificação é feita por meio de curvas analíticas no extrato da matriz para compensar o efeito.

3.8.4 Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

O LOD_i e o LOQ_i referem-se aos limites de detecção e quantificação, respectivamente, em relação ao instrumento, expressos em $\mu\text{g L}^{-1}$. O LOD_m e LOQ_m referem-se aos limites do método, ou seja, a concentração real nas amostras e são obtidos através da relação entre o fator de diluição do método e os limites do instrumento, expressos em $\mu\text{g L}^{-1}$.

No método proposto houve etapas de diluição da amostra, desse modo, os limites em relação ao instrumento e ao método foram diferentes. Considerou-se o LOQ_m a menor concentração que, fortificada na matriz, apresentasse resultados de recuperações entre 70 e 120%, com RSD menor ou igual a 20% (SANCO, 2013). O LOD_m foi calculado dividindo-se o valor de LOQ_m por 3,33. O LOD_i e LOQ_i para cada analito foram estimados em relação ao LOD_m e LOQ_m , dividindo os valores pela diluição e levando em consideração a relação sinal ruído calculada pelo *software* do equipamento, considerando no mínimo 3 e 10 vezes essa razão, respectivamente.

3.8.5 Exatidão e precisão

A determinação da exatidão do método baseou-se na avaliação dos resultados de recuperação conforme estabelecido no item 2.10. Os níveis de fortificação utilizados para avaliar a recuperação foram 10, 25 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$, com seis réplicas de extração para cada nível. A exatidão, expressa em percentagem de recuperação foi calculada com auxílio do *software* (MassLynx V 4.1) do equipamento. A precisão do método, em termos de repetitividade (RSD_r) foi avaliada pela análise das réplicas de fortificações da matriz branco, com $n=6$ para cada nível de concentração. Avaliou-se a precisão intermediária (RSD_{pi}) do método realizando o procedimento analítico em três dias diferentes.

3.9 APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS REAIS

O método desenvolvido foi aplicado para determinação de resíduos dos agrotóxicos em estudo em 12 amostras de bebidas à base de soja, de diferentes marcas e sabores, com diferenças na composição. As amostras foram obtidas em

supermercados da cidade de Santa Maria – RS e analisadas de acordo com o método validado.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA UHPLC-MS/MS PARA A DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM BEBIDAS À BASE DE SOJA

A fase móvel do sistema UHPLC-MS/MS foi otimizada constituindo-se de dois solventes operando em gradiente linear (Tabela 5), com vazão de $0,225 \text{ mL min}^{-1}$, volume de injeção $10 \mu\text{L}$ e tempo total de análise de 10 minutos. A fase aquosa (A) foi uma solução composta por 98% de água e 2% de metanol e a fase orgânica (B) metanol, ambas contendo 0,1% (v/v) de ácido fórmico e 5 mmol L^{-1} de formiato de amônio como aditivos. O uso de aditivos na fase móvel permite melhora na separação cromatográfica, além de favorecer o processo de ionização dos compostos. Recomenda-se a utilização de aditivos com baixas concentrações salinas ($< 10 \text{ mmol L}^{-1}$) e elevada volatilidade, para que não causem contaminação da fonte de ionização e supressão de sinal. A utilização do ácido fórmico em modo positivo forma íons $[M + H]^+$ e com o formiato de amônio ocorre formação de adutos de amônio $[M + \text{NH}_4]^+$, reduzindo a formação de adutos de sódio provenientes de vidrarias e impurezas de solventes (CASS & CASSIANO, 2015).

Tabela 5 - Gradiente linear de fase móvel do sistema UHPLC-MS/MS.

Tempo (min)	%A	%B
Inicial	95	5
0,25	95	5
7,75	0	100
8,50	0	100
8,51	95	5
10,0	95	5

O mesmo gradiente de fase móvel e condições semelhantes do espectrômetro de massas foram utilizados por RIZZETTI (2013) para determinação de resíduos de agrotóxicos em suco de laranja integral, utilizando o sistema UHPLC-MS/MS.

As condições estabelecidas para o espectrômetro de massas foram:

- Temperatura da coluna: $40 \text{ }^\circ\text{C}$;
- Capilar: $2,0 \text{ kV}$;
- Temperatura de dessolvatação: $500 \text{ }^\circ\text{C}$;

- Vazão do gás: 600 L h⁻¹;
- Vazão no cone: 80 L h⁻¹;
- Vazão do gás de colisão: 0,15 mL min⁻¹;
- Temperatura da fonte de ionização: 150 °C.

A ionização dos compostos foi em modo positivo, exceto para o ácido giberélico, que ocorreu em modo negativo. As informações de tempo de retenção, parâmetros de energia de colisão e transições relativas ao SRM utilizado para cada agrotóxico são apresentadas na tabela 6.

Tabela 6 - Agrotóxicos e respectivos tempos de retenção, íons precursores, íons produto, energias de colisão e voltagem do cone.

(continua)

Composto	t _R (min)	1ª Transição (Quantificação)			2ª Transição (Confirmação)			Voltagem do cone (V)
		Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	Energia de colisão (eV)	Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	Energia de colisão (eV)	
Carbendazim	2,77	192,1	160,1	18	192,1	132,1	28	24
Ácido Giberélico	3,63	345,2	239,2	16	345,2	143,1	28	21
Imazetapir	4,49	290,2	245,2	18	290,2	159,1	38	35
Cianazina	4,57	241	214	17	241	96	25	28
Bentazona	4,63	241,1	199,1	12	241,1	107,2	26	12
Metribuzim	4,73	215	131	18	215	89	20	33
Tiofanato-metílico	4,76	343,1	151	21	343,1	311,1	11	23
Imazaquim	4,83	312,2	267,2	20	312,2	86,2	28	29
Sulfentrazone	5,03	387	307	20	387	145	46	27
Ácido 4-indol-3-ilbutírico	5,07	204,2	186,1	14	204,2	130,1	24	20
Diclosulam	5,20	406,1	161	30	406,1	378	15	37
Atrazina-d5 ^a	5,40	221	179	18	221	101	23	26
Flutriafol	5,47	302,1	70,2	18	302,1	123,1	29	23
Clorantraniliprole	5,74	482	451	22	482	284	14	20
Clomazone	5,80	240	125	18	240	89	46	23
Azoxistrobina	5,92	404	372	15	404	329	30	17
Dimetenamida-P	6,04	276	244	14	276	168	26	17
Clorimurrom	6,16	415,1	186	15	415,1	83	40	25
Miclobutanil	6,32	289,1	70,2	18	289,1	125,1	32	25
Fluquinconazol	6,39	376	348,8	18	376	306,9	30	37
Ciproconazol	6,42	292,2	70,2	18	292,2	125,1	24	27
Procimidona	6,46	284,1	256,1	17	284,1	67,1	28	33
Epoxiconazol	6,51	330	121,04	22	330	101	50	25
Tetraconazol	6,51	372	159	30	372	70,1	20	32

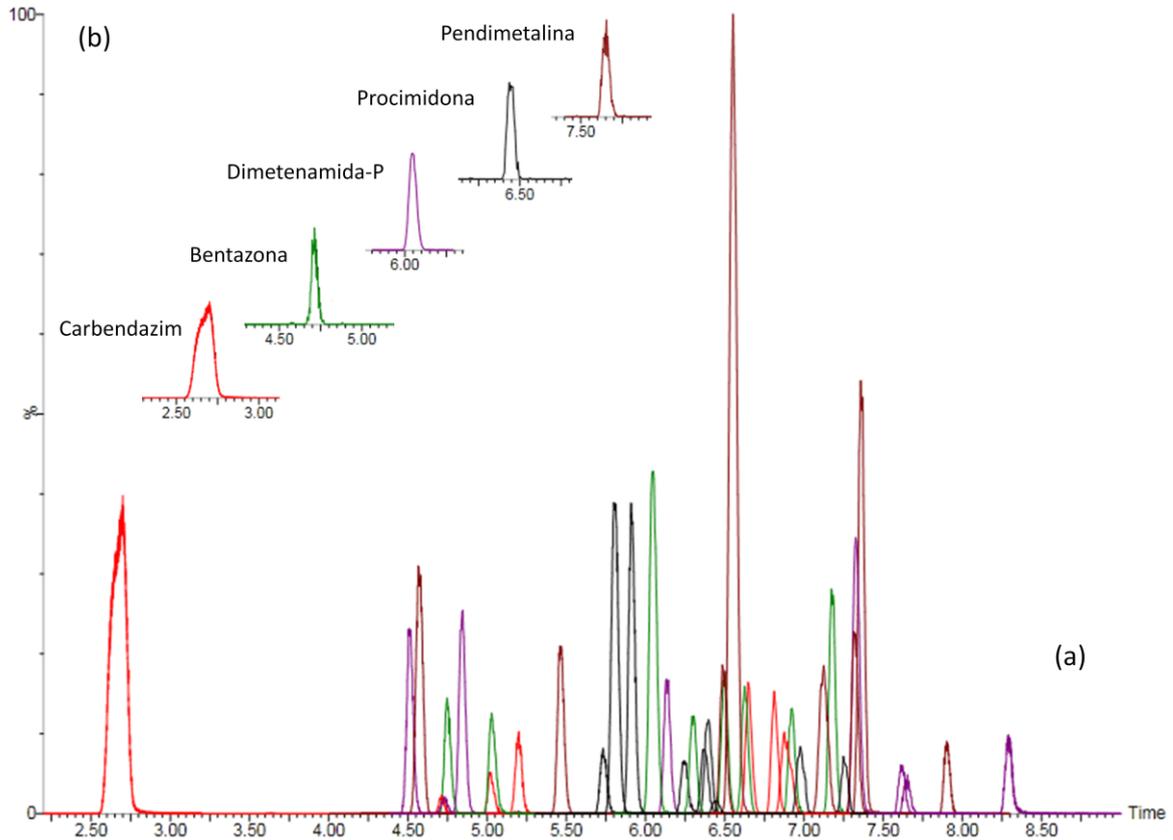
Composto	t_R (min)	1ª Transição (Quantificação)			2ª Transição (Confirmação)			Voltagem do cone (V)
		Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	Energia de colisão (eV)	Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	Energia de colisão (eV)	
Metolacoloro	6,56	284,1	252,1	15	284,1	176,1	25	17
Alacloro	6,58	287,2	161,1	25	287,2	238,2	16	8
Diflubenzurom	6,66	311	158	12	311	141	28	20
Picoxistrobina	6,66	368	205,1	10	368	145,1	22	10
Tebuconazol	6,84	308	70,1	22	308	125	40	31
Propiconazol	6,90	342	159	34	342	69	22	37
Trifenilfosfato ^b	6,91	327,2	215,2	28	327,2	152,1	37	40
Piraclostrobina	6,95	388,1	193,9	12	388,1	163	25	20
Metconazol	7,01	320,1	70	22	320,1	125	36	29
Difenoconazol	7,16	406	251,1	25	406	111,1	60	37
Trifloxistrobina	7,20	409	145	40	409	186	16	25
Cletodim	7,28	360	164	18	360	268,1	12	23
Fenoxaprope-P	7,35	362,1	288,1	20	362,1	121,1	25	35
Quizalofope-P	7,36	373	299,1	18	373	91,1	32	30
Fluasifope-P	7,40	384,1	282,1	22	384,1	328,1	16	27
Clorpirifós	7,66	349,9	198	20	349,9	97	32	27
Pendimetalina	7,70	282,2	212,2	10	282,2	194,1	17	12
Clorfluazurom	7,95	539,8	382,9	20	539,8	158	20	33
Etofenprox	8,33	394,3	177	15	394,3	106,9	43	17

^a Padrão de controle

^b Padrão interno

A Figura 9 (a) representa o cromatograma de íons totais (TIC) obtido para os compostos quantificados e (b) as transições SRM de alguns compostos representativos analisados neste trabalho, na concentração de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ em extrato da matriz branco.

Figura 9 - (a) cromatograma de íons totais obtido por meio de UHPLC-MS/MS a partir de uma solução de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ preparado na matriz, cromatograma (B) SRM de alguns compostos representativos.



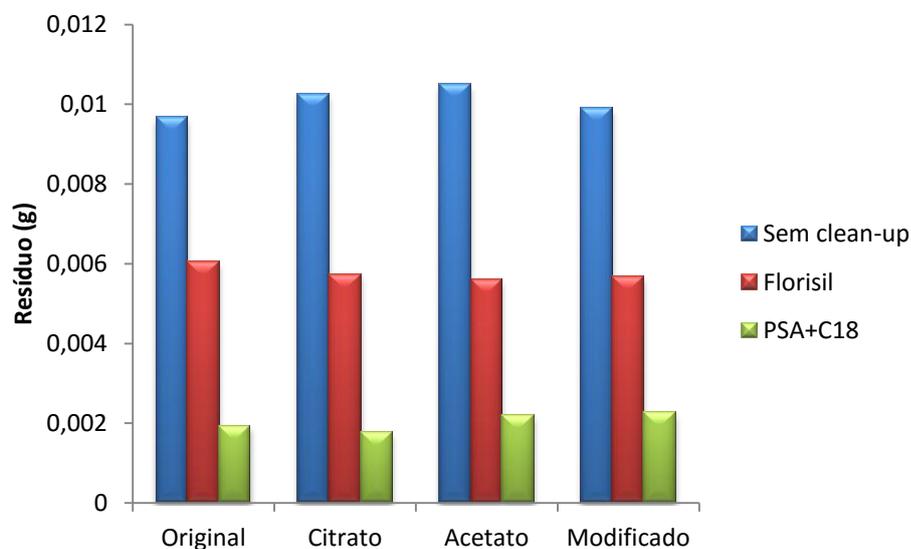
4.2 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM BEBIDAS À BASE DE SOJA

Bebidas à base de soja são matrizes complexas, com alto teor de açúcar, gordura e proteínas, portanto, requerem atenção especial na etapa de preparo de amostra. Assim, diferentes modificações do métodos QuEChERS foram avaliadas em termos de capacidade de fornecer boa extração dos analitos com o mínimo de componentes indesejáveis que possam interferir na análise. Conforme descrito no item 3.7, como testes iniciais, foram realizados diferentes ensaios de extração e limpeza a fim de otimizar o método QuEChERS.

Testes gravimétricos foram utilizados para determinar o teor de lipídios totais em amostras de peixes por Tölgyessy & Miháliková (2016), com base na diferença das massas dos tubos antes e depois da secagem dos extratos. A Figura 10 representa a quantidade de resíduos restantes nos tubos após a aplicação de cada

método e diferentes limpezas, avaliados por teste gravimétrico. Tal como descrito por Anastassiades *et al.* (2007) observou-se que o extrato obtido pelo método QuEChERS citrato apresentou menos quantidades de co-extrativos, quando comparado com as versões original e acetato. O método QuEChERS modificado é uma adaptação do QuEChERS acetato, utilizando quantidades diferentes de sais. As medidas gravimétricas empregadas nos testes preliminares para avaliar a eficiência de limpeza mostraram que na etapa de extração/partição com QuEChERS citrato, utilizando PSA e C18 como sorventes, os extratos finais ficaram mais limpos e também foram removidos mais (> 80%) co-extrativos do extrato. Diferente disso, quando Florisil foi empregado como único sorvente, aproximadamente 50% dos co-extrativos foram removidos.

Figura 10- Resíduos restantes após diferentes extrações e limpezas avaliadas por teste gravimétrico.



A combinação de PSA e C18 remove mais co-extrativos devido à retenção dos ácidos graxos livres e outros compostos polares da matriz por PSA, que possui elevado efeito quelante, devido à presença dos grupos amino primário e secundário na sua estrutura. Além disso, a utilização de C18 é particularmente eficaz para amostras com relativamente elevado teor de lipídios, visto que esse sorvente possui um caráter extremamente retentivo para os compostos não-polares, como gorduras (BORGES *et al.*, 2015; GONZÁLEZ-CURBELO *et al.*, 2015).

Quando comparado aos outros métodos, o QuEChERS citrato foi o mais adequado para a extração de agrotóxicos em bebidas à base de soja, por apresentar o maior número de compostos recuperados em acordo com a faixa de aceitação (70-120%) definida pela SANCO (2013).

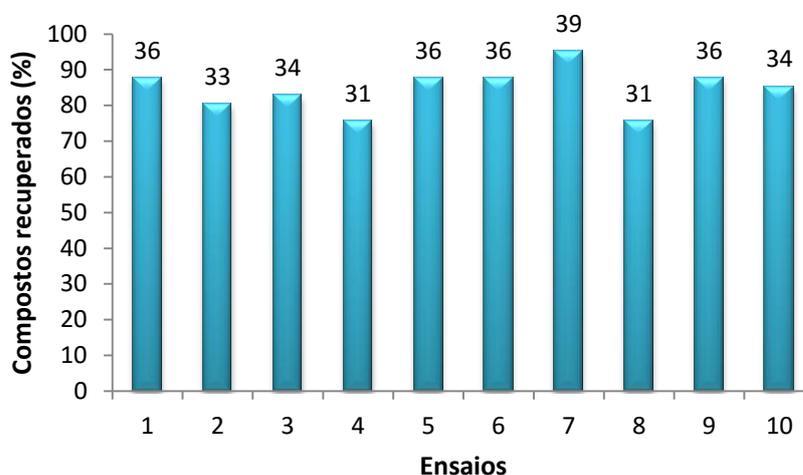
No total, 41 compostos foram analisados por meio dos métodos propostos. Recuperações entre 70% e 120% e RSD $\leq 20\%$ foram adotados como resultados satisfatórios. Os compostos com resultados aceitáveis para cada teste foram 29 (QuEChERS acetato e modificado) e 30 (QuEChERS original e citrato).

Devido aos resultados satisfatórios de recuperação e ao teste gravimétrico apresentar menor quantidade de resíduo não volátil quando da utilização de QuEChERS citrato e limpeza com PSA e C18, optou-se pela escolha deste método, com a otimização destes sorventes pelo planejamento experimental, uma vez que a sua combinação fornece uma limpeza mais eficaz.

4.2.1 Planejamento fatorial 2²

Após a escolha do melhor método de extração, foi realizada a otimização da etapa de limpeza através de planejamento fatorial 2², com uso de repetição em duplicata do ponto central e extrapolação dos níveis das variáveis para $-\alpha=0$ e $+\alpha=150$ e 600 mg de PSA e C18, respectivamente. A realização dos 10 ensaios ocorreu conforme descrito no item 3.7.2. Os percentuais de compostos que apresentaram valores de recuperação e RSD aceitáveis nos ensaios realizados estão representados na Figura 11.

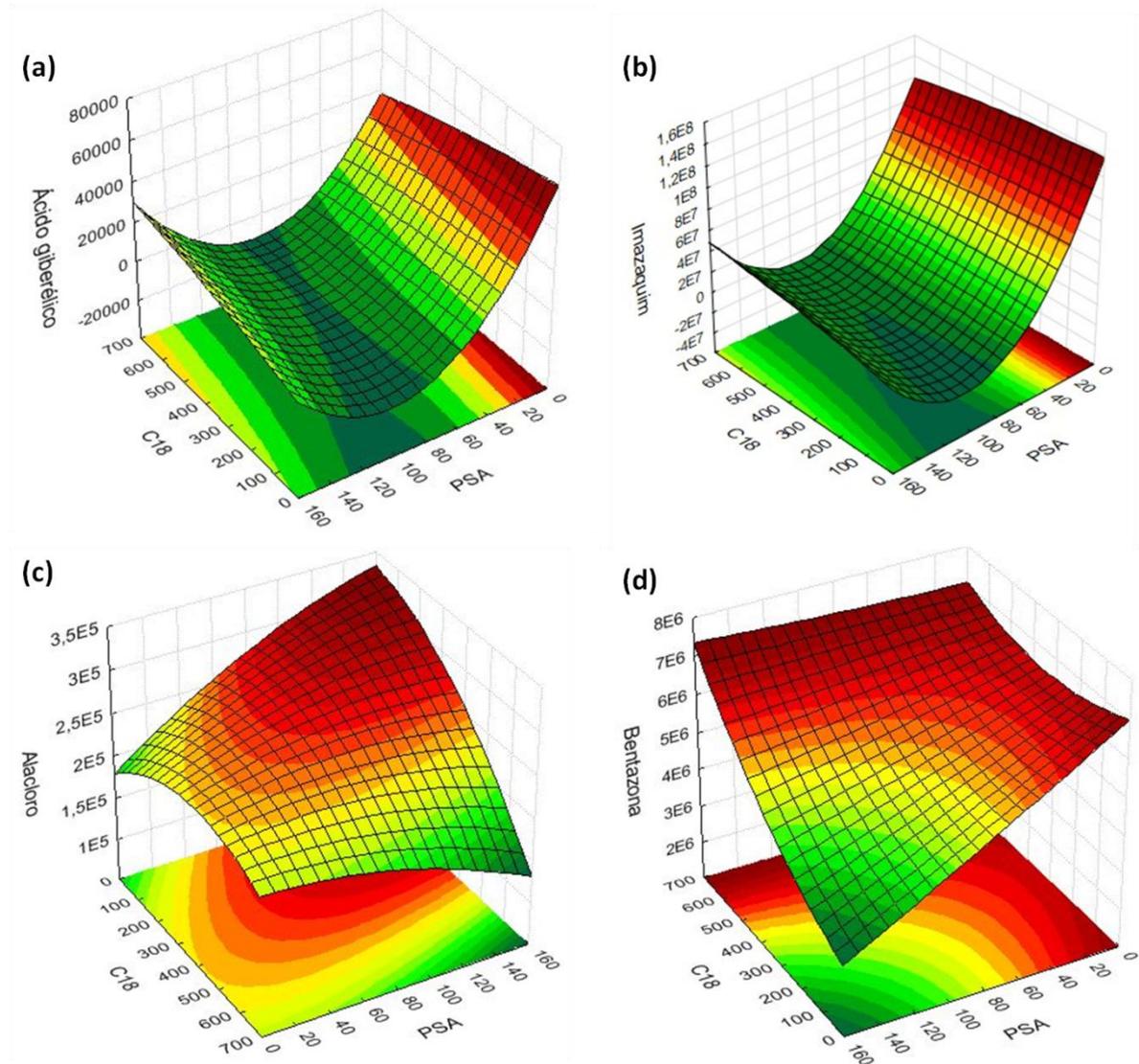
Figura 11 - Resultados em porcentagem do número de compostos com recuperação satisfatória (70-120%, RSD \leq 20%) nos ensaios realizados para o planejamento fatorial.



A etapa de limpeza mais eficiente foi aquela em que não se usou PSA, que corresponde ao ensaio 7, que utilizou apenas 240 mg de C18 para limpeza dos extratos. Dos 41 compostos analisados, 39 foram recuperados com condições satisfatórias após o planejamento, 10 a mais que nos testes preliminares. Destes, clorfluazurom apresentou recuperação de 126%. Para o alacloro não se conseguiu resultados de recuperação nas faixas aceitáveis, provavelmente devido a diminuição da área da resposta desse composto, quando do aumento da quantidade de C18, como mostrado na Figura 12 c.

Os compostos não recuperados nos testes preliminares, como o ácido giberélico (Figura 12 a), imazaquin (Figura 12 b) e bentazona (Figura 12 d) apresentam superfícies de resposta que evidenciam o aumento das áreas dos picos quando o PSA não é usado. Isto pode ser devido à estrutura do PSA, que retém fortemente os compostos polares (PRESTES *et al.*, 2011), diminuindo as recuperações.

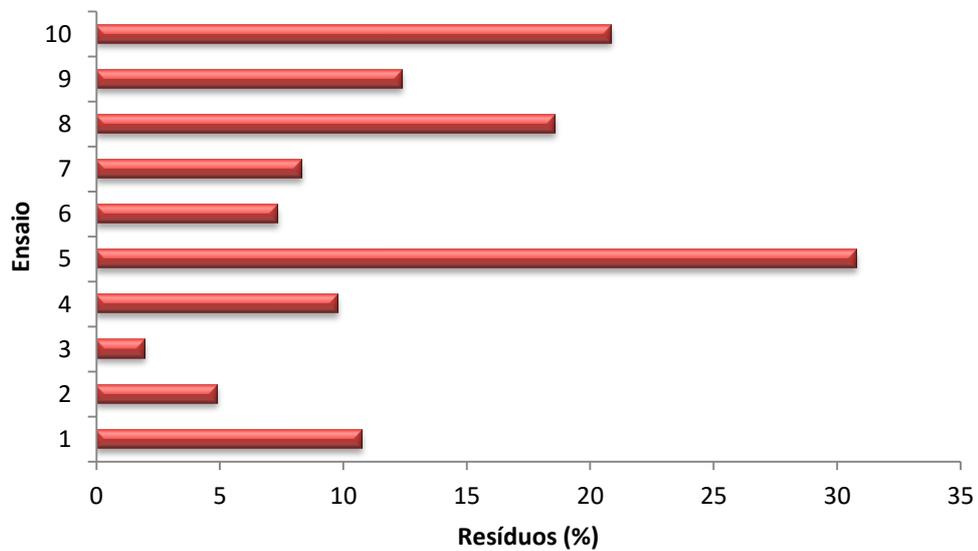
Figura 12 - Superfícies de resposta geradas pelo planejamento experimental para os compostos (a) ácido giberélico, (b) imazaquin, (c) alacloro e (d) bentazona.



O uso de C18 é eficaz para amostras com elevada quantidade de lipídios e não afeta negativamente as recuperações dos agrotóxicos, ao contrário do que acontece com o uso de maiores quantidades de PSA, que podem diminuir as recuperações de alguns compostos polares. Assim, este método utiliza apenas C18 para remover gorduras, já que o PSA não foi necessário e diminuiu as recuperações (GONZÁLEZ-CURBELO *et al.*, 2015). Além disso, a limpeza dos extratos foi satisfatória, de acordo com os resultados do teste gravimétrico realizado, como mostra a Figura 13, que representa a porcentagem de resíduos restantes para cada ensaio do planejamento experimental. Pode-se observar que o ensaio 3 (500 mg de

C18 e 25 mg de PSA) foi o que obteve melhor limpeza. Entretanto, o ensaio 7 (240 mg de C18) obteve a maior recuperação de compostos, com limpeza satisfatória. Vale ressaltar que além da melhoria no método, pelo aumento do número de compostos recuperados, não usar PSA gera economia, tendo em vista o elevado custo desse sorvente.

Figura 13 - Resíduos remanescentes na etapa de limpeza com base no planejamento experimental avaliados por teste gravimétrico.

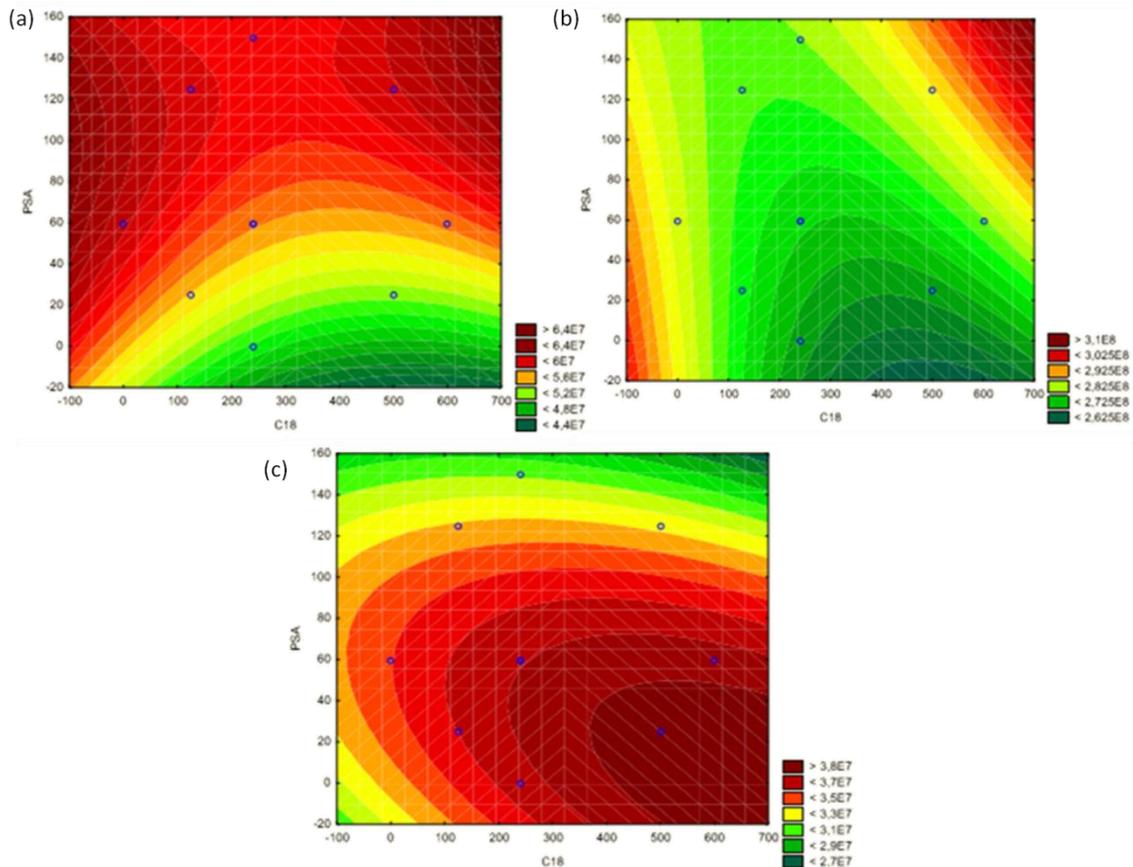


A análise das superfícies de resposta individuais dos compostos permite visualizar que para alguns dos agrotóxicos não recuperados nos testes preliminares, a condição escolhida foi a que apresentou resposta máxima para os mesmos. Isso foi observado para o ácido giberélico, ácido 4-indol-3-ilbutírico, clorimuron etílico, diclosulam, imazaquim e imazetapir.

Para outros compostos, como miclobutanil e propiconazol, mudanças nas condições de limpeza representariam melhora nas áreas dos picos. A Figura 14 (a) mostra a superfície de resposta para o composto miclobutanil, onde a resposta máxima poderia ser alcançada se durante a etapa de limpeza fosse empregado apenas 60 mg de PSA. Isso também ocorre para a trifloxistrobina. Entretanto, a melhoria nas áreas dos picos implicaria em extratos com mais interferentes, prejudicando o equipamento e aumentando o efeito matriz para outros compostos.

No caso do alacloro, a condição escolhida também não foi a mais favorável, motivo provável pelo qual não foi recuperado no menor nível de fortificação.

Figura 14 – Superfícies de resposta dos compostos (a) miclobutanil, (b) etofenprox e (c) sulfentrazona gerados pelo planejamento experimental.



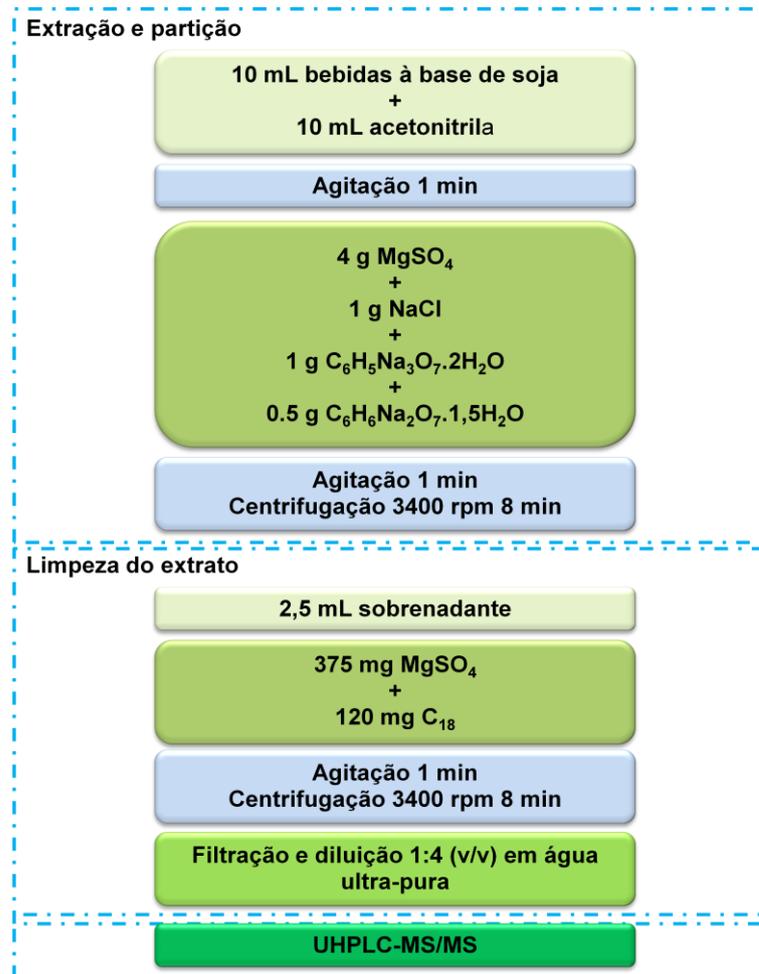
O etofenprox (Figura 14 b) possui efeito matriz acentuado, portanto, deveria ocorrer aumento na resposta devido a presença de menos resíduos no extrato (teste 3 – 500 mg de C18 e 25 mg de PSA). Entretanto, apresenta sua condição de resposta máxima quando não é utilizado C18. Isso se explica pela sua elevada lipofilicidade, motivo pelo qual o composto pode sofrer interações com o sorvente ou ainda com componentes da matriz que são mais retidos na etapa de limpeza. A sulfentrazona (Figura 14 c) também apresenta efeito matriz pronunciado, sendo que a condição de resposta máxima para esse composto é aquela em que foram removidos mais resíduos do extrato (teste 3).

No caso de agrotóxicos como azoxistrobina, carbendazim e clorfluazurom, apesar da condição ótima não ter sido utilizada, as variações não alteram a área dos picos em grandes proporções, não interferindo nos resultados. Em outros compostos, como tetraconazol e difenoconazol, mesmo que o teste escolhido tenha sido o que apresentou resposta mínima, os resultados foram satisfatórios.

Para os compostos que poderiam apresentar melhorias se outras condições fossem empregadas, utilizar a condição ideal implicaria em diminuição do efeito matriz, possibilidade de diminuição de LOQ e melhorias nas recuperações e RSD dos mesmos. Isso seria útil em caso de análise dos agrotóxicos isolados. Entretanto, como se trata de um método multirresíduo, as condições foram escolhidas conforme o maior número de compostos recuperados com parâmetros satisfatórios.

As superfícies de resposta dos demais compostos podem ser vistas no Anexo 2. Embora cada composto seja influenciado de maneira diferente pelo uso dos sorventes, gerando superfícies variadas, não há grande perda em área dos picos. Portanto, de acordo com os resultados obtidos, a melhor condição obtida para a limpeza dos extratos foi o uso da quantidade intermediária de C18 aliada ao $MgSO_4$. A Figura 15 demonstra o método QuEChERS utilizado para a validação.

Figura 15 - Representação do método utilizado na determinação de resíduos de agrotóxicos em bebidas à base de soja, utilizando método QuEChERS citrato.



4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO OTIMIZADO

A validação do método foi realizada conforme descrito no item 3.8, sendo os parâmetros avaliados descritos a seguir. Os níveis de fortificação na matriz 10, 25 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ correspondem no equipamento a 2, 5 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, devido à diluição do extrato de 1:4 em água ultra-pura antes da injeção no sistema UHPLC-MS/MS.

4.3.1 Seletividade

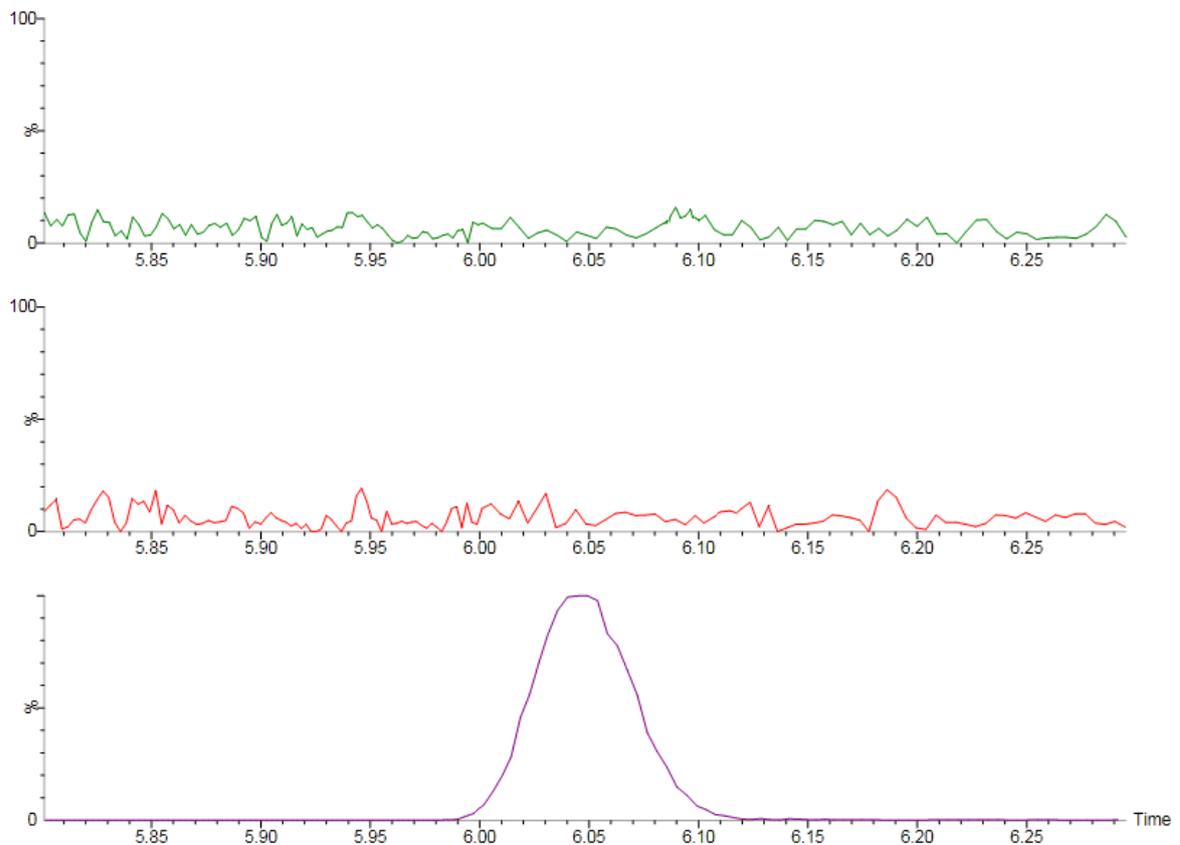
O método foi considerado seletivo, uma vez que não foram detectados picos de interferência na faixa cromatográfica de interesse, ou seja, nos mesmos tempos de

retenção dos analitos estudados (Figura 16). Assim, a amostra branco foi utilizada para preparar as curvas de calibração e ensaios de fortificação.

Os solventes e reagentes também foram avaliados para assegurar a ausência de contaminantes que possam interferir na análise, usando o procedimento de extração, não contendo amostra. Nessa avaliação, também observou-se a ausência de interferentes.

Pode-se notar no cromatograma de íons totais (TIC) que há sobreposição de compostos entre si. Entretanto, devido a seletividade da técnica de espectrometria de massas em série podemos distinguir cada um dos analitos de acordo com seus íons característicos.

Figura 16 – Demonstração da ausência de picos cromatográficos de interferentes no tempo de retenção do composto dimetenamida-P nas amostras (a) branco reagente e (b) amostra branco e (c) pico cromatográfico de composto dimetenamida-P fortificado na matriz no nível $20 \mu\text{g L}^{-1}$.



4.3.2 Faixa de trabalho e curva analítica

A linearidade do método proposto foi assegurada pela aplicação da regressão linear aos pontos da curva analítica. As Tabelas 7 e 8 apresentam os valores de coeficiente angular (a), coeficiente linear (b) e coeficiente de determinação (r^2) para os compostos selecionados para a curva em acetonitrila e em extrato branco da matriz, respectivamente. A linearidade foi observada na faixa de 10 a 250 $\mu\text{g L}^{-1}$, correspondendo a faixa de 2 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ no equipamento para todos os compostos, exceto para alacloro e etofenprox, os quais apresentaram faixa linear de 25 a 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ correspondendo a faixa de 5 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ no equipamento.

Todos os compostos apresentaram coeficiente de determinação maior que 0,99. A curva de calibração utilizada para quantificação foi a curva no extrato branco da matriz.

A estabilidade do equipamento foi comprovada através do uso do padrão interno trifenílfosfato, pela repetibilidade do sinal do sistema cromatográfico em todas as injeções.

Tabela 7 - Regressão linear para a curva analítica preparada em acetonitrila.

Composto	Inclinação (a)	Intercepção (b)	r^2
Ácido Giberélico	25386,73	-10465,51	0,9999
Alacloro	43270,49	-68584,01	0,9960
Azoxistrobina	17575365,88	4590473,34	0,9990
Ácido 4-indol-3-ilbutírico	9352596,83	11629379,19	0,9927
Bentazona	1248152,40	1254107,96	0,9915
Cianazina	27304467,6	5508360,54	0,9983
Clorpirifós	2180609,02	-817129,69	0,9996
Carbendazim	50497406,02	2864226,53	0,9998
Clorimurom	10294667,63	2958560,75	0,9990
Cletodim	3727782,51	1308693,05	0,9967
Clomazone	29384537,09	19284796,40	0,9990
Ciproconazol	8857291,72	4195461,76	0,9985
Clorfluazurom	1569711,24	-383606,83	0,9996
Clorantraniliprole	3438899,18	586369,44	0,9984
Diflubenzurom	6666687,22	5990702,76	0,9955
Difenoconazol	19715408,20	4192055,26	0,9993
Diclosulam	5792837,25	3226321,40	0,9976
Dimetenamida-P	24883783,36	8683164,01	0,9991

(continua)

Composto	Inclinação (a)	Intercepção (b)	r ²
Etofenprox	1443182,63	-776631,78	0,9988
Epoxiconazol	11160193,66	10604262,88	0,9955
Fluasifope-P	22881950,17	375720,34	0,9996
Fenoxaprope-P	15678938,35	676043,14	0,9997
Flutriafol	8545787,90	7199434,89	0,9965
Fluquinconazol	2809279,95	2706955,93	0,9947
Imazaquim	15665112,81	4811548,92	0,9993
Imazetapir	11332614,67	2591307,70	0,9990
Metolaclo	56591004,03	30229780,95	0,9984
Metribuzim	908555,79	174599,73	0,9959
Miclobutanil	4837829,42	5012124,53	0,9948
Metconazol	7379507,27	3463731,20	0,9980
Pendimetalina	1814656,82	-1044881,17	0,9987
Propiconazol	10615030,88	7622212,53	0,9959
Procimidona	1016810,21	732313,02	0,9987
Piraclostrobina	5949981,65	-1602667,65	0,9996
Picoxistrobina	5626530,60	749620,28	0,9991
Quizalofope-P	23012588,94	8363925,91	0,9990
Sulfentrazona	5143917,86	5261191,91	0,9930
Tiofanato-metílico	9196120,65	1975266,20	0,9979
Tebuconazol	9196572,57	7226212,91	0,9954
Tetraconazol	10964630,08	15855850,57	0,9902
Trifloxistrobina	7720389,89	94435,44	0,9995

Tabela 8 - Regressão linear para a curva analítica preparada em extrato branco da matriz.

(continua)

Composto	Inclinação (a)	Intercepção (b)	r ²
Ácido Giberélico	17354,61	-15956,13	0,9975
Alacloro	32131,75	-58026,37	0,9926
Azoxistrobina	19404433,69	1848228,79	0,9993
Ácido 4-indol-3-ilbutírico	3281234,60	1842929,84	0,9970
Bentazona	971356,26	-541508,02	0,9954
Cianazina	16239688,78	21215793,66	0,9981
Clorpirifós	2249801,28	-554044,28	0,9991
Carbendazim	50269949,58	-478762,23	0,9994
Clorimurom	9075165,62	479013,25	0,9987
Cletodim	1217208,66	318311,36	0,9975
Clomazone	30490572,24	3223826,65	0,9994
Ciproconazol	8119884,91	1004698,92	0,9992

Composto	Inclinação (a)	Intercepção (b)	r ²
Clorfluazurom	1057586,89	342679,87	0,9927
Clorantranilprole	3269264,55	-470899,54	0,9997
Diflubenzurom	5107914,46	1026578,09	0,9991
Difenoconazol	15952942,62	-710815,38	0,9981
Diclosulam	1646544,20	402114,03	0,9958
Dimetenamida-P	25954941,57	3585763,23	0,9990
Etofenprox	5204524,81	1739219,22	0,9971
Epoxiconazol	10469106,85	3760600,17	0,9972
Fluasifope-P	23695402,54	6419428,59	0,9993
Fenoxaprope-P	15651296,84	1255992,25	0,9990
Flutriafol	7617434,49	1629214,12	0,9993
Fluquinconazol	2293775,51	251813,15	0,9989
Imazaquim	14149749,24	-99994,87	0,9995
Imazetapir	10467003,28	712796,44	0,9994
Metolacoloro	63192577,19	21807249,01	0,9986
Metribuzim	557367,20	-308130,01	0,9970
Miclobutanil	4355956,22	850703,35	0,9992
Metconazol	6506499,26	2406017,59	0,9962
Pendimetalina	2194292,38	-67932,80	0,9978
Propiconazol	8856903,91	1134812,20	0,9981
Procimidona	925244,68	-527549,25	0,9978
Piraclostrobina	6645676,76	763919,21	0,9983
Picoxistrobina	6898297,14	74452,65	0,9985
Quizalofope-P	23296992,35	7966017,31	0,9984
Sulfentrazona	3206811,43	1051167,38	0,9973
Tiofanato-metílico	7268142,50	56756,52	0,9991
Tebuconazol	7927826,63	1248502,31	0,9987
Tetraconazol	9338513,06	4593607,80	0,9977
Trifloxistrobina	8159651,45	460235,70	0,9996

4.3.3 Efeito matriz

O efeito matriz foi estimado conforme a equação 1, do item 3.8.3 e para a maioria dos compostos, não foi considerado significativo, já que os valores estão na faixa de $\pm 20\%$ (FERRER *et al.* 2011). No entanto, para alguns compostos, como clorfluazuron e sulfentrazona, o efeito matriz apresentou maior intensidade, sendo de 57,67 e -56,18%, respectivamente. O mecanismo exato desse efeito não é completamente elucidado, sendo provavelmente originado da competição entre o

analito e componentes não voláteis da matriz pela transferência de elétrons do capilar para a solução e a separação de cargas na superfície das gotas que irão dar origem aos íons em fase gasosa. Devido a isso, as curvas foram preparadas no extrato branco da matriz para a quantificação dos analitos.

Antes da análise cromatográfica, os extratos foram diluídos 5 vezes com água, a fim de reduzir o efeito matriz e a quantidade de matriz injetada no equipamento, bem como a ter melhores formas dos picos. Os valores encontrados para o efeito matriz são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Avaliação do efeito matriz dos agrotóxicos avaliados.

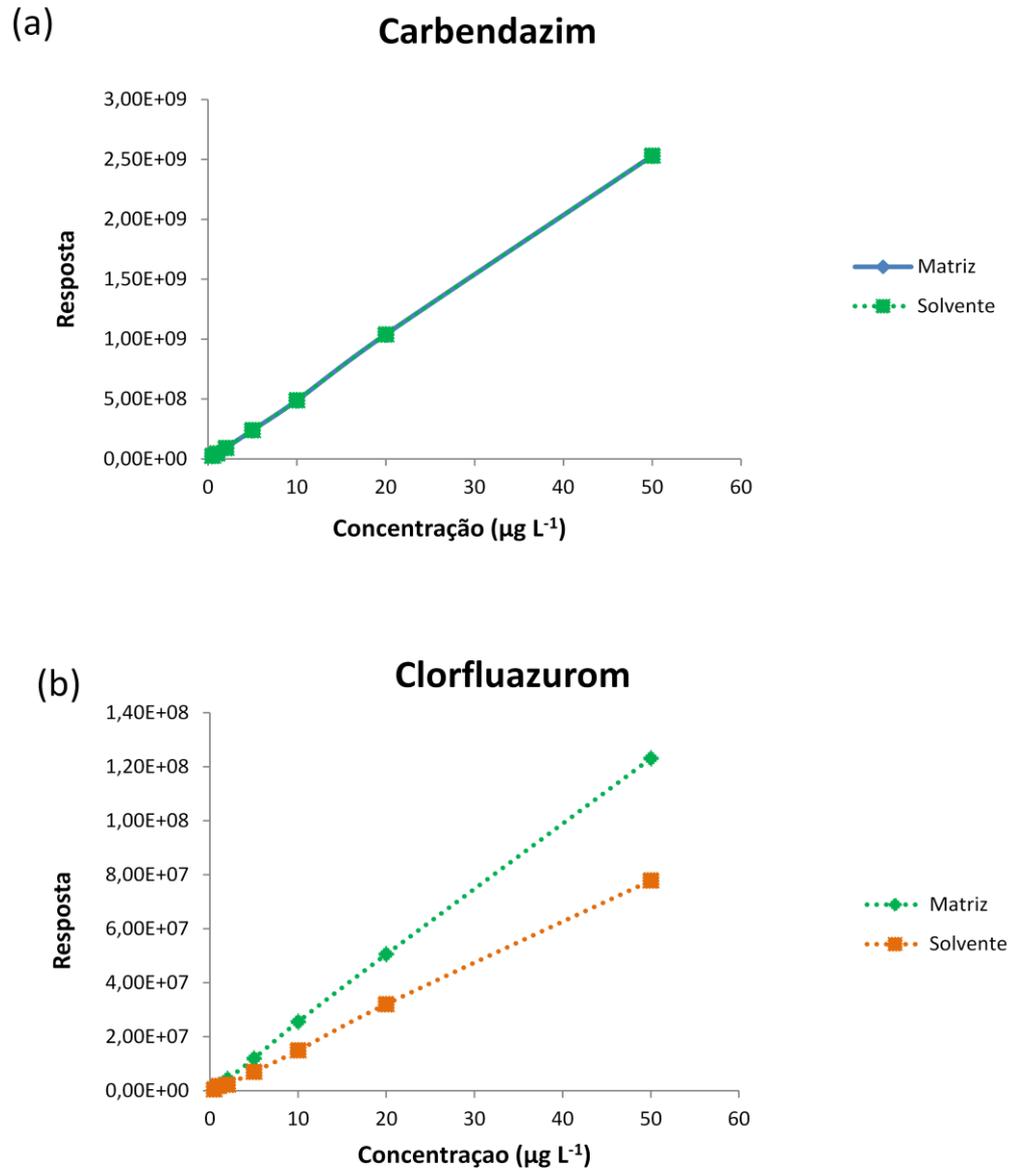
(continua)

Composto	Efeito Matriz (%)
Ácido Giberélico	-0,7
Alacloro	-1,0
Azoxistrobina	3,1
Ácido 4-indol-3-ilbutírico	-74,3
Bentazona	-37,6
Cianazina	-21,1
Clorpirifós	2,1
Carbendazim	0,7
Clorimurom	-5,6
Cletodim	-34,1
Clomazone	0,8
Ciproconazol	-6,5
Clorfluazurom	57,7
Clorantraniliprole	-5,9
Diflubenzurom	-25,1
Difenoconazol	-13,9
Diclosulam	-21,6
Dimetenamida-P	-3,7
Etofenprox	208,3
Epoconazol	-5,5
Fluasifope-P	2,7
Fenoxaprope-P	2,6
Flutriafol	-7,9
Fluquinconazol	-11,5
Imazaquim	-4,2
Imazetapir	0,8
Metolacoloro	-0,7
Metribuzim	-39,1

Composto	Efeito Matriz (%)
Miclobutanil	-9,9
Metconazol	-13,1
Pendimetalina	1,5
Propiconazol	-12,1
Procimidona	4,2
Piraclostrobina	2,6
Picoxistrobina	-1,9
Quizalofope-P	1,2
Sulfentrazona	-56,2
Tiofanato-metílico	-21,3
Tebuconazol	-11,8
Tetraconazol	-10,6
Trifloxistrobina	4,0

A Figura 17 mostra a comparação das curvas de calibração em solvente e na matriz para os compostos (a) carbendazim e (b) clorfluazurom, demonstrando claramente que o efeito matriz para o carbendazim é praticamente nulo, enquanto pra o clorfluazuron esse efeito é pronunciado. Assim, percebe-se a importância da quantificação de amostras utilizando curvas de calibração preparadas no extrato branco da matriz.

Figura 17 – Curvas analíticas preparadas no solvente e no extrato branco da matriz para os compostos (a) carbendazim e (b) clorfluazurom.



4.3.4 Limite de detecção e quantificação

O LOQ do método foi estabelecido como o menor nível de fortificação com recuperações e RSD satisfatórios e o LOD foi estimado sendo o valor do LOQ dividido por 3,33. Os valores de LOD_m e LOQ_m foram de 3 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a maioria dos compostos analisados, respectivamente. Alacloro e etofenprox apresentaram LOD_m e LOQ_m de 8 e 25 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Como não há legislação vigente para bebidas à base de soja, os limites são inferiores aos estabelecidos para os compostos permitidos em soja (ANVISA 2015), assim, o método é adequado para a análise de amostras reais.

O LOQ do instrumento foi estabelecido em relação LOD_m e LOQ_m , dividindo os valores pela diluição e levando em consideração a relação sinal ruído calculada pelo *software* do instrumento. Para a maioria dos compostos, o LOD_i e LOQ_i foram 0,6 e 2 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Alacloro e etofenprox apresentaram LOD_i e LOQ_i de 1,5 e 5 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

4.3.5 Exatidão e precisão

Para avaliar a exatidão do método, foram realizados ensaios de fortificação conforme descrito no item 3.8.5, utilizando os níveis de 10, 25 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$. Esses níveis foram escolhidos tendo em conta os LMR estabelecidos pela legislação nacional para grãos de soja. O nível 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ foi utilizado também para a determinação do LOQ do método. Nos casos em que não houveram resultados satisfatórios, o nível 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ foi adotado para realizar a quantificação. A repetitividade foi avaliada pela análise das réplicas de fortificações da matriz branco, com $n=6$ para cada nível de concentração.

Para cálculo da recuperação, foram utilizadas curvas analíticas no extrato branco da matriz. Todos os compostos apresentaram resultados satisfatórios conforme a SANCO (2013), com recuperações entre 70% e 112% e $RSD \leq 19\%$, exceto alacloro e etofenprox, que não apresentaram resultados satisfatórios de recuperação no menor nível de fortificação. Provavelmente, isto é devido à diminuição das áreas de analitos, quando aumenta a quantidade de C18. Os resultados de recuperação e RSD para os compostos podem ser vistos na Tabela 10.

A precisão intermediária do método foi realizada em dias diferentes, utilizando a fortificação no nível 25 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os valores de recuperação e RSD para a precisão

intermediária podem ser observados na Tabela 10. Verificou-se que a precisão intermediária apresentou recuperações de 70% a 114% com o RSD $\leq 15\%$, sendo considerado satisfatório.

O padrão de controle atrazina-d5 foi fortificado na mesma concentração dos analitos, mostrou bons resultados de recuperação e precisão (104, 98 e 103% de recuperação com RSD 18, 5 e 3% para os níveis 10, 25 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente) garantindo a eficiência da extração.

Tabela 10 – Percentuais de recuperação e RSD para repetitividade e precisão intermediária do método.

(continua)

Composto	Recuperação (RSD)% ($\mu\text{g L}^{-1}$)			Precisão intermediária
	10	25	50	25
Ácido Giberélico	89 (10)	87 (19)	99 (9)	94 (14)
Alacloro	171 (14)	88 (7)	82 (11)	86 (14)
Azoxistrobina	99 (4)	98 (3)	104 (2)	100 (7)
Ácido 4-indol-3-ilbutírico	84 (9)	99 (10)	109 (2)	98 (11)
Bentazona	99 (8)	93 (11)	95 (11)	96 (9)
Cianazina	81 (3)	101 (6)	112 (4)	97 (8)
Clorpirifós	75 (13)	78 (10)	78 (4)	80 (10)
Carbendazim	100 (5)	95 (4)	99 (3)	93 (7)
Clorimurom	91 (9)	93 (5)	99 (3)	99 (9)
Cletodim	74 (5)	75 (8)	87 (8)	98 (14)
Clomazone	95 (3)	95 (5)	101 (3)	97 (6)
Ciproconazol	89 (5)	93 (4)	99 (4)	97 (9)
Clorfluazurom	88 (9)	100 (10)	107 (8)	91 (11)
Clorantraniliprole	91 (6)	99 (6)	106 (3)	101 (9)
Diflubenzurom	94 (4)	95 (9)	100 (5)	93 (10)
Difenoconazol	90 (3)	91 (4)	99 (5)	95 (7)
Diclosulam	95 (4)	97 (5)	103 (5)	106 (10)
Dimetenamida-P	98 (3)	96 (5)	103 (2)	99 (8)
Etofenprox	63 (5)	75 (12)	74 (8)	72 (3)
Epoxiconazol	80 (5)	99 (6)	109 (5)	99 (8)
Fluasifope-P	75 (3)	84 (8)	91 (5)	93 (9)
Fenoxaprope-P	81 (5)	89 (6)	95 (4)	93 (7)
Flutriafol	85 (2)	95 (5)	103 (3)	96 (8)
Fluquinconazol	71 (8)	98 (9)	107 (6)	96 (9)
Imazaquim	94 (2)	93 (3)	100 (2)	96 (7)
Imazetapir	99 (4)	93 (6)	99 (4)	95 (7)
Metolaclo	92 (5)	94 (3)	102 (4)	94 (8)
Metribuzim	95 (5)	88 (12)	95 (8)	85 (11)

Composto	Recuperação (RSD)% ($\mu\text{g L}^{-1}$)			Precisão intermediária
	10	25	50	25
Miclobutanil	80 (10)	98 (8)	105 (6)	97 (11)
Metconazol	86 (8)	94 (5)	99 (6)	92 (8)
Pendimetalina	75 (10)	80 (12)	77 (7)	80 (9)
Propiconazol	78 (5)	96 (5)	102 (4)	93 (6)
Procimidona	84 (14)	98 (12)	110 (10)	114 (15)
Piraclostrobina	90 (6)	95 (5)	99 (6)	93 (6)
Picoxistrobina	103 (7)	91 (4)	100 (4)	95 (7)
Quizalofope-P	73 (4)	87 (5)	96 (4)	92 (7)
Sulfentrazona	90 (16)	100 (6)	111 (6)	102 (8)
Tiofanato-metílico	78 (5)	75 (6)	81 (2)	70 (6)
Tebuconazol	83 (6)	96 (7)	99 (4)	94 (8)
Tetraconazol	70 (9)	99 (5)	112 (2)	102 (9)
Trifloxistrobina	83 (8)	90 (6)	98 (3)	93 (6)

4.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS REAIS

O método desenvolvido foi aplicado na avaliação de 12 amostras de bebidas à base de soja, conforme descrito no item 3.9.

Não foram encontrados resíduos dos analitos alvo nas amostras ou eles estavam abaixo do LOD do método. Para garantir a eficácia do método, 6 dessas amostras foram selecionadas aleatoriamente e fortificadas no nível do LOQ ($10 \mu\text{g L}^{-1}$). Os resultados de recuperação foram satisfatórios, provando que o método pode ser aplicado para quantificação dos compostos em amostras diferentes, com composições um pouco variáveis.

A ausência de resíduos pode ser devida ao reduzido número de amostras. No entanto, é importante realizar o monitoramento desses compostos e outros utilizados nas culturas de soja, para garantir a segurança alimentar e saúde da população.

4.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método proposto provou ser eficaz para a extração de 41 agrotóxicos em bebidas à base de soja. As condições da etapa de limpeza foram otimizadas utilizando planejamento experimental, que demonstrou que a utilização de C18 foi suficiente para remover interferentes e melhorar resultados de recuperação, quando comparado com as limpezas que utilizaram PSA. Jeong *et al.* 2012 utilizaram método QuEChERS com otimização por análise de superfícies de resposta para a determinação de 14 agrotóxicos em amostras de leite, conseguindo recuperações satisfatórias para 10 destes. Li *et al.* 2013 utilizaram QuEChERS para extração de 8 compostos em leite e iogurte, utilizando PSA como sorvente de limpeza, necessitando uma etapa extra de congelamento dos extratos para remoção de gordura. O método QuEChERS citrato é um procedimento simples e rápido, com poucas etapas, o que minimiza erros. Além disso, a utilização apenas de C18 como sorvente de limpeza promove limpeza efetiva e reduz os custos, tendo em vista o elevado preço do PSA.

O uso do planejamento experimental é uma ferramenta importante para a otimização de métodos, tendo em vista que puderam ser estabelecidas as melhores condições de extração e limpeza dos extratos.

A quantificação foi realizada com curvas na matriz branco, com a finalidade de compensar o efeito matriz, pronunciado para alguns compostos. Hernández-Borges *et al.* 2005 realizaram análise de 5 agrotóxicos em leite de soja combinando extração em fase sólida e eletroforese capilar com detecção por espectrometria de massas, alcançando limites de quantificação na faixa de 247 a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. No método proposto, o LOQm para a maioria dos compostos foi 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, correspondendo a um LOQi de 2 g $\mu\text{g L}^{-1}$. O uso de UHPLC-MS/MS a provou ser seletivo e sensível. O método proposto mostrou ser eficaz, rápido, abrangendo uma grande gama de compostos e pode ser utilizado na análise de rotina.

5 CONCLUSÃO

A relevância desse trabalho é fundamentada na garantia da segurança do alimento, tendo em vista o aumento crescente do consumo de bebidas à base de soja. Essas bebidas representam fonte saudável de proteínas e compostos benéficos, entretanto podem conter resíduos de agrotóxicos remanescentes da cultura de soja.

Entre os avanços da química analítica, esforços têm sido aplicados no âmbito do desenvolvimento de técnicas pró-ecológicas e econômicas. O método de extração QuEChERS citrato, otimizado neste trabalho, é moderno e dinâmico, apresenta simplificação de etapas e reduz possibilidades de erros e contaminação cruzada. Além disso, é barato e ambientalmente correto, devido ao baixo consumo de solventes orgânicos.

A realização do planejamento fatorial foi de extrema importância, tendo em vista que permitiu encontrar um procedimento otimizado, para atender as necessidades propostas nesse trabalho. O uso dessa ferramenta minimiza o período de realização de testes e conseqüentemente o consumo desnecessário de reagentes.

A etapa de limpeza destacou-se durante o desenvolver do trabalho, visto que diferentes combinações e proporções de sorventes podem influenciar na qualidade do extrato obtido. Um extrato com menor quantidade de coextrativos contribui para a manutenção de todo o sistema de detecção, além de influenciar na recuperação dos analitos em estudo. Destaca-se que o uso apenas de C18 como sorvente garantiu limpeza efetiva dos extratos, além de ter reduzido custos na análise.

O uso do sistema UHPLC-MS/MS com aditivos na fase móvel e condições específicas aplicadas à fonte de ionização possibilitaram a determinação dos resíduos de agrotóxicos, com limites de quantificação menores do que os LMR estabelecidos para grãos de soja, sendo assim um método passível de utilização para o objetivo proposto.

Vale salientar que não existe legislação vigente que estabeleça limites máximos de resíduos nessas bebidas. Aliado a isso, não existem trabalhos que relatem a importância de avaliar esses compostos nessa matriz. Então, pode-se destacar a relevância desse trabalho, como meio de garantia da segurança

alimentar por meio de um método analítico sensível, rápido e barato, além de ambientalmente amigável.

6 DESTINAÇÃO DOS RESÍDUOS GERADOS

Os resíduos gerados no desenvolvimento desse trabalho, tanto sólidos quanto líquidos, foram encaminhados ao almoxarifado do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria, rotulados e devidamente separados. Os resíduos sólidos foram descartados em sacos plásticos. Os resíduos líquidos em frascos identificados como halogenados, não-halogenados e resíduos de álcool e acetona, utilizados para limpeza do material de laboratório. A destinação correta desses resíduos é feita por uma empresa terceirizada especializada, licenciada para essa finalidade.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Ampliação do escopo de compostos determinados;
- Aplicação e otimização do método para bebidas à base de soja com diferentes composições, tais como sucos de sabores diversos;
- Comparação do método proposto com técnicas miniaturizadas de extração.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AB SCIEX – API 4000™ LC/MS/MS System, Hardware Manual. Abril, 2010. Disponível em: <<http://sciex.com/products/mass-spectrometers/triple-quad-systems/api-4000-system>>. Acesso em 10 de janeiro de 2016.

AB SCIEX - Introduction to LC-MS. Dr. Michael Baynham - Senior Specialist, Mass Spectrometry Applications. 2006. Disponível em: <<http://www.metbio.net/docs/metbio-bmsresource-kaahu611630-24-07-2009.pdf>>. Acesso em 10 de janeiro de 2016.

ALDER, L.; GREULICH, K.; KEMPE, G.; VIETH, B. Residue analysis of 500 high priority pesticides: better by GC–MS or LC–MS/MS? **Mass Spectrometry Reviews**, v. 25, p. 838–865, 2006.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S.; ŠTAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive solid-phase extraction for the determination of pesticides in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, p. 412–431, 2003.

ANASTASSIADES, M.; SCHERBAUM, E.; TASDELEN, B.; STAJNBAHER, D. em: Ohkawa H, Miyagawa H, Lee PW (Eds.), **Crop Protection, Public Health, Environmental Safety**, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2007.

ANDRÉS, V.; VILLANUEVA, M. J.; TENORIO, M. D. Simultaneous determination of tocopherols, retinol, ester derivatives and β -carotene in milk and soy-juice based beverages by HPLC with diode-array detection. **LWT - Food Science and Technology**, v. 58, p. 557-562, 2014.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2003). **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2015). **Monografias autorizadas**. Disponível em: <<http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/i>> Acesso em 20 de agosto de 2015.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2015). **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA)**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Programa+de+Analise+de+Residuos+de+Agrotoxicos+em+Alimentos>>. Acesso em 28 de outubro de 2015.

BEHRENS, J. H. & DA SILVA, M. A. A. P. Atitude do consumidor em relação à soja e produtos derivados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, p. 431-439, 2004.

BENASSI, V. T.; PRUDENCIO, S. H.; VARÉA, G. S. Tofus de diferentes cultivares de soja: perfil sensorial e correlação com medidas instrumentais e de composição química. **Alim. Nutr.**, v. 23, p. 555-565, 2012.

BONATO, E. R.; BONATO, A. L. V. **A soja no Brasil: história e estatística**. 1 ed. Londrina: Embrapa Soja, 1987.

BORGES, K. B.; FIGUEIREDO, E. C.; QUEIROZ, M. E. C. (Org.). **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. 1 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2015.

BRITO, N. M.; JUNIOR, O. P. A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129 - 146, 2003.

CALDAS, E. D.; SOUZA, L. C. K. R. Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, p. 529-537, 2000.

CALLOU, K. R. A. **Teor de isoflavonas e capacidade antioxidante de bebidas à base de soja**. Dissertação de Mestrado, 30 p., USP, São Paulo, 2009.

CARRÃO-PANIZZI, M. C. & MANDARINO, J. M. G. **Soja: Potencial de uso na dieta brasileira**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1998.

CASS, Q. B.; CASSIANO, N. M. (Org.). **Cromatografia líquida: novas tendências e aplicações**. 1 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

CEN (EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION), CEN/TC 275 15662:2008: Foods of plant origin - Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE - QuEChERS-method, European Union, 2008.

CHANG, J. B.; MOON, W.; BALASUBRAMANIAN, K. S. Consumer valuation of health attributes for soy-based food: A choice modeling approach. **Food Policy**, v. 37, p. 335–342, 2012.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos **Química Nova**, v. 31, p. 623-636, 2008.

CIELECKA-PIONTEK, J.; ZALEWSKI, P.; JELINSKA, A.; PIOTR, A. J. UHPLC: The Greening Face of Liquid Chromatography. **Chromatographia**, v.76, p. 1429–1437, 2013.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento (2016). **Acompanhamento da safra brasileira de grãos. Safra 2015/16, janeiro de 2016**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> , acessado em 10 de janeiro de 2016.

CUNICO, M. W. M. *et al.* Planejamento fatorial: uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica. **Visão Acadêmica**, v. 9, p. 23-32, 2008.

DALL'AGNOL, A.; ROESSING, A. C.; LAZZAROTTO, J. J.; HIRAKURI, M. H.; OLIVEIRA, A. B. **O complexo agroindustrial da soja**. 1 ed. Londrina: Embrapa Soja, 2007.

DASHPER, S.G.; SAION, B.N.; YUAN, Y.; REYNOLDS, E.C.; STACEY, M.A.; MANTON, D.J.; COCHRANE, N.J.; STANTON, D.P. Acidogenic potential of soy and bovine milk beverages. **Journal of dentistry**, v. 40, p. 736–741, 2012.
DURANTI, M. Grain legume proteins and nutraceutical properties. **Fitoterapia**, v. 77, p. 67–82, 2006.

DARIO, G. J. A.; MARTIN, T. N.; NETO, D. D.; MANFRON, P. A. BONNECARRÈRE, R. A. G.; CRESPO, P. E. N. Influência do uso de fitorregulador no crescimento da soja. **Revista da FZVA**, v.12, p. 63-70, 2005

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Tecnologias de produção de soja – Região Central do Brasil 2014**. 1 ed. Londrina: Embrapa Soja, 2013.

ENDO, S.; PFENNIGSDORFF, A.; GOSS, K. Salting-out effect in aqueous NaCl solutions: trends with size and polarity of solute molecules. **Environmental Science and Technology**, v. 46, p. 1496–1503, 2012.

FERNANDES, V. C.; DOMINGUES, V. F.; MATEUS, N.; AND DELERUE-MATOS, C. Determination of Pesticides in Fruit and Fruit Juices by Chromatographic Methods. An Overview. **Journal of Chromatographic Science**, v. 49, p. 715-730, 2011.

FERRER, C.; LOZANO, A.; AGÜERA, A.; JIMÉNEZ GIRÓN, A.; FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 7634–7639, 2011.

FONTANA, C. E. & BALESTRASSI, P. P. Uma abordagem experimental para a otimização da rentabilidade de extração de proteína de soja na produção de bebidas. **P&D em Engenharia de Produção**, v. 9, p. 58-66, 2011.

GENOVESE, M. I.; BARBOSA, A. C. L.; PINTO, M. S.; LAJOLO, F. M. Commercial Soy Protein Ingredients as Isoflavone Sources for Functional Foods. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 62, p. 53–58, 2007.

GILBERT-LÓPEZ, B.; GARCÍA-REYES, J. F.; MOLINA-DÍAZ, A. Sample treatment and determination of pesticide residues in fatty vegetable matrices: A review. **Talanta**, v. 79, 109–128, 2009.

GOLD, L. S.; SLONE, T. H.; AMES, B. N.; MANLEY, N. B. Pesticide Residues in Food and Cancer Risk: A Critical Analysis. **Handbook of Pesticide Toxicology**, v. 1, p. 799-843, 2001.

GOLGE, O. & KABAK, B. Evaluation of QuEChERS sample preparation and liquid chromatography–triple-quadrupole mass spectrometry method for the determination of 109 pesticide residues in tomatoes. **Food Chemistry**, v. 176, p. 319–332, 2015.

GONZÁLEZ-CURBELO, M. A.; SOCAS-RODRÍGUEZ, B.; HERRERA-HERRERA, A. V.; GONZÁLEZ-SÁLAMO, J.; HERNÁNDEZ-BORGES, J.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M. A. Evolution and applications of the QuEChERS method. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 169–185, 2015.

HE, F. J.; CHEN, J. Q. Consumption of soybean, soy foods, soy isoflavones and breast cancer incidence: Differences between Chinese women and women in Western countries and possible mechanisms. **Food Science and Human Wellness**, v. 2, p. 146–161, 2013.

HERNÁNDEZ-BORGES, J.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M. Á.; GARCA-MONTELONGO, F. J.; CIFUENTES, A. Analysis of pesticides in soy milk combining solid-phase extraction and capillary electrophoresis-mass spectrometry. **J. Separation Science**, v. 28, p. 948 – 956, 2005.

HIRAKURI, M. H.; DE CASTRO, C.; FRANCHINI, J. C. **Indicadores de sustentabilidade da cadeia produtiva de soja no Brasil**. 1 ed. Londrina: Embrapa Soja, 2014.

HIRAKURI, M. H.; LAZZAROTTO, J. J. **O agronegócio da soja nos contextos mundial e brasileiro**. 1 ed. Londrina: Embrapa Soja, 2014.

HOU, X.; HAN, M.; DAI, X. H.; YANG, X. F.; YI, S. A multi-residue method for the determination of 124 pesticides in rice by modified QuEChERS extraction and gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 138, p. 1198–1205, 2013.

IÇIER, F.; GÜNDÜZ, G. T.; YILMAZ, B.; MEMELI, Z. Changes on some quality characteristics of fermented soy milk beverage with added apple juice. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, p. 57-64, 2015.

INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. DOQ CGCRE008, Rev. 3, 2010.

JAEKEL, L. Z.; RODRIGUES, R. S.; SILVA, A. P. Avaliação físico-química e sensorial de bebidas com diferentes proporções de extratos de soja e de arroz. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 342-348, 2010.

JEONG, I. S.; KWAK, B. M.; AHN, J. H.; JEONG, S. H. Determination of pesticide residues in milk using a QuEChERS-based method developed by response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 133, p. 473-481, 2012.

JOVANOVIĆ, P. *et al.* Development of multiresidue DLLME and QuEChERS based LC–MS/MS method for determination of selected neonicotinoid insecticides in honey liqueur. **Food Research International**, v. 55, p. 11–19, 2014.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 1, p. 35-61, 2009.

LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKA, K.; LIGHTFIELD, A. R. Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. **J. AOAC INT**, v. 88, p. 615-629, 2005.

LI, N. *et al.* A modified QuEChERS method for the determination of some herbicides in yogurt and milk by high performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 105, p. 219–228, 2013.

LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida**. 1 ed. Rio de Janeiro: AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 2011.

LOPES, M. N. T. **Pesticidas mais empregados na cultura de soja no município de Dourados (MS): determinação em água para consumo humano**. Tese de doutorado, 115 p., Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

MALDANER, L. & JARDIM, I. C. S. F. UHPLC – Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. **Scientia Chromatographica**, v. 4, p. 197-207, 2012.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2016) – **Soja**. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/soja>> Acesso em 07 de janeiro de 2016.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2015) – **Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC vegetal)**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/qualidade-seguranca-alimentos-bebidas/alimentos/residuos-e-contaminantes>>. Acesso em 10 de outubro de 2015.

MARTINS, H. A. **Estudo de determinação de resíduos de glifosato e ácido aminometilfosfônico (AMPA) em amostras de soja e água usando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem com ionização por electrospray (LC-ESI-MS/MS)**. Dissertação de mestrado, 121 p., Autarquia Associada à Universidade De São Paulo, São Paulo, 2005.

MORRISON, S. A.; SIEVE, K. K.; RATAJCZAK, R. E.; BRINGOLF, R. B.; BELDEN, J. B. Simultaneous extraction and cleanup of high-lipid organs from white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) for multiple legacy and emerging organic contaminants using QuEChERS sample preparation. **Talanta**, v. 146, p. 16–22, 2016.

NETO, B. de B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**. 4ª ed., Bookman, 2010, cap: 6.

NISHINARI, K.; FANG, Y.; GUO, S.; PHILLIPS, G. O. Soy proteins: A review on composition, aggregation and emulsification. **Food Hydrocolloids**, v. 39, p. 301-318, 2014.

NOUGADÈRE, A.; MERLO, M.; HÉRAUD, F.; RÉTY, J.; TRUCHOT, E.; VIAL, G.; CRAVEDI, J. P.; LEBLANC, J. C. How dietary risk assessment can guide risk management and food monitoring programmes: The approach and results of the

French Observatory on Pesticide Residues (ANSES/ORP). **Food Control**, v. 41, p. 32-48, 2014.

PASCHOAL, J. A. R.; RATH, S.; AIROLDI, F. P. S.; REYES, F. G. R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v. 31, p. 1190-1198, 2008.

PEREIRA-FILHO, E. R.; POPPI, R. J.; ARRUDA, M. A. Z. Emprego de planejamento fatorial para a otimização das temperaturas de pirólise e atomização de Al, Cd, Mo e Pb por ETAAS. **Química Nova**, v. 25, p. 246-253, 2002.

PINHO, G.P.; NEVES, A.A.; QUEIROZ, M.E.L.R.; SILVÉRIO, F.O. Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. **Química Nova**, v. 32, p. 987-995, 2009.

POTTER, R.M.; DOUGHERTY, M.P.; HALTEMAN, W.A.; CAMIREB, M.E. Characteristics of wild blueberry–soy beverages. **LWT Food Science and Technology**, v. 40, p. 807–814, 2007.

PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS – Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, p. 1620-1634, 2009.

PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 3, p. 51-64, 2011.

QUEIROZ, S. C. N.; FERRACINI, V. L.; ROSA, M. A. Validação de método multirresíduo para determinação de pesticidas em alimentos empregando QuEChERS e UPLC-MS/MS. **Química Nova**, v. 35, p. 185-192, 2012.

RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, F. A. L. *et al.* Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, p. 164-171, 2008.

RIZZETTI, T. M.; KEMMERICH, M.; MARTINS, M. L.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Optimization of a QuEChERS based method by means of central composite design for pesticide multiresidue determination in orange juice by UHPLC–MS/MS. **Food Chemistry**, v. 196, p. 25–33, 2016.

ROSTAGNO, M. A.; PALMA, M.; BARROSO, C. G. Ultrasound-assisted extraction of isoflavones from soy beverages blended with fruit juices. **Analytica Chimica Acta**, v. 597, p. 265–272, 2007

SANCO (2013). Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Commission of the European communities. SANCO/12571/2013.

SINDIVEG - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal (2015) – Entrevista com Ivan Sampaio, gerente de informação, maio de 2015. Disponível em: <<http://sindiveg.org.br/>>, acesso em 10 de dezembro de 2015.

SOARES, W. L. Uso dos agrotóxicos e seus impactos à saúde e ao ambiente: uma avaliação integrada entre a economia, a saúde pública, a ecologia e a agricultura. Tese de doutorado, 163 p., Fundação Osvaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2010.

SOLER, C.; MANES, J.; PICÓ, Y. Routine application using single quadrupole liquid chromatography–mass spectrometry to pesticides analysis in citrus fruits. **Journal of Chromatography A**, v. 1088, p. 224–233, 2005.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, p. 338-350, 2006.

TÖLGYESSY, P.; MIHÁLIKOVÁ, Z. Rapid determination of total lipids in fish samples employing extraction/partitioning with acetone/ethyl acetate solvent mixture and gravimetric quantification. **Food Control**, v. 60, p. 44-49, 2016.

USDA – United States Departamento of Agriculture (2015) - **National Nutrient Database for Standard Reference Release 28**. Disponível em: <<http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/4243?manu=&fgcd=Beverages>> Acesso em 20 de outubro de 2015.

YARITA, T.; IWATA, H.; OTAKE, T.; WATAI, M.; AOYAGI, Y.; MITSUDA, H.; KURODA, Y.; FUJIKAWA, T.; NUMATA, M.; OTA, H. Development of soybean certified reference material for pesticide residue analysis. **Talanta**, v. 119, p. 255–261, 2014.

YUSA, V.; MILLET, M.; COSCOLLA, C.; ROCA, M. Analytical methods for human biomonitoring of pesticides. A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 891, p. 15-31, 2015.

ZHANG, X.; SHU, X. O.; GAO, Y. T.; YANG, G.; LI, Q.; LI, H.; JIN, F.; ZHENG, W. Soy Food Consumption Is Associated with Lower Risk of Coronary Heart Disease in Chinese Women. *Journal of Nutrition*, v. 133, p. 2874–2878, 2003.

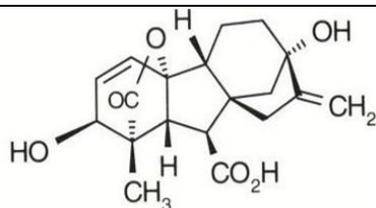
WANG, H.; DING, J.; REN, N. Recent advances in microwave-assisted extraction of trace organic pollutants from food and environmental samples. **Trends in Analytical Chemistry**, 2015, [http://dx.doi.org/doi: 10.1016/j.trac.2015.05.005](http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.trac.2015.05.005).

WILKOWSKA, A. & BIZIUK, M. Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. **Food Chemistry**, v. 125, p. 803–812, 2011.

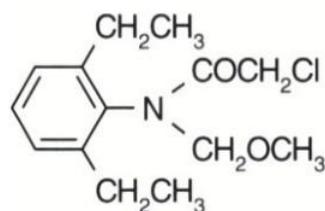
ANEXO 1

Fórmulas estruturais dos agrotóxicos estudados nesse trabalho

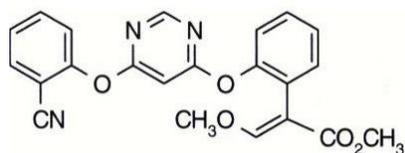
Ácido Giberélico



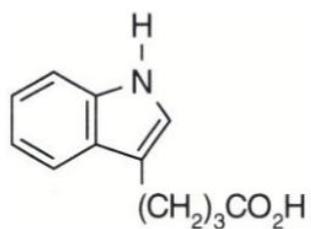
Alacloro



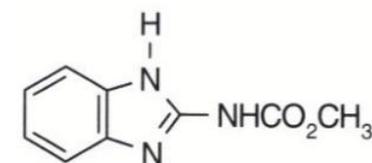
Azoxistrobina



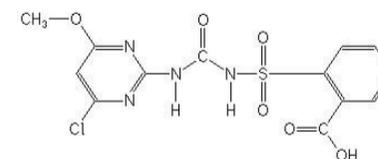
Ácido 4-indol-3-ilbutírico



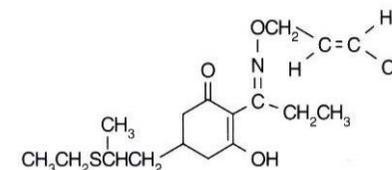
Carbendazim



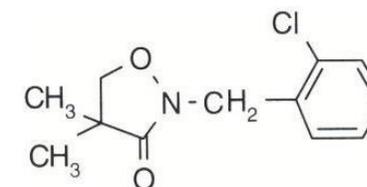
Clorimurrom



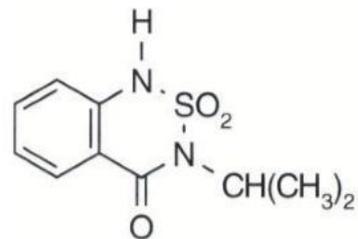
Cletodim



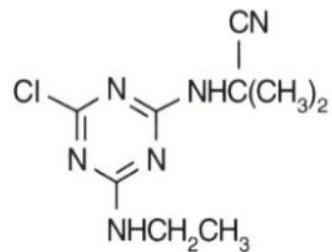
Clomazone



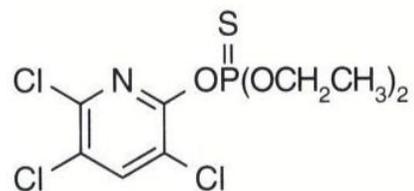
Bentazona



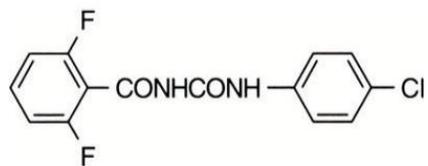
Cianazina



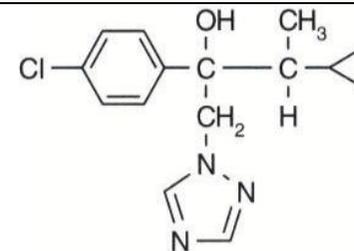
Clorpirifós



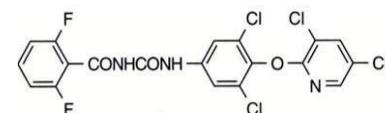
Diflubenzurom



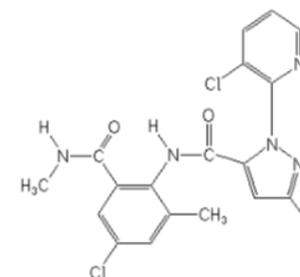
Ciproconazol



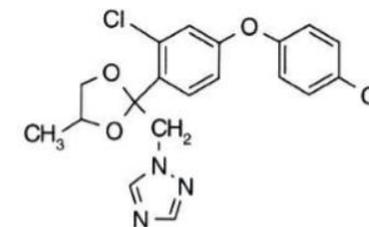
Clorfluazurom



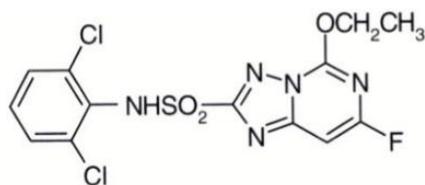
Clorantraniliprole



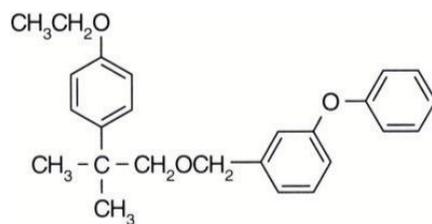
Difenoconazol



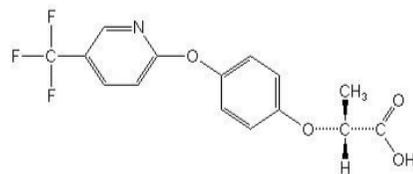
Diclosulam



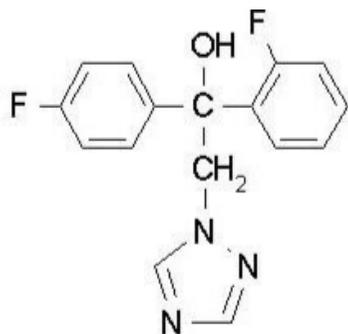
Etofenprox



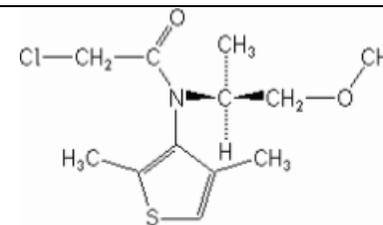
Fluasifope-P



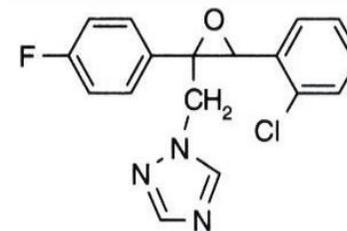
Flutriafol



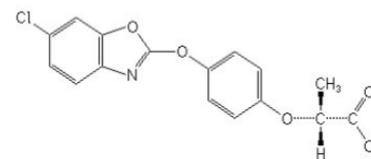
Dimetenamida-P



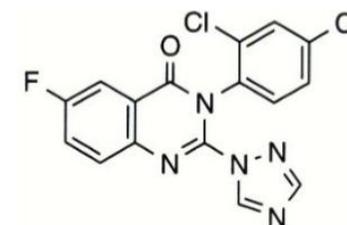
Epoxiconazol



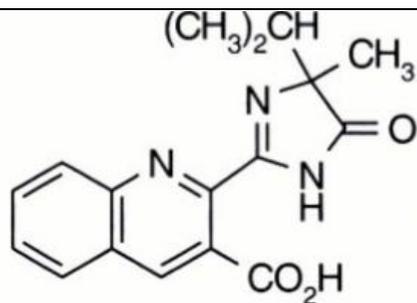
Fenoxaprope-P



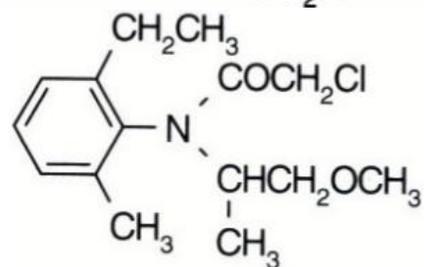
Fluquinconazol



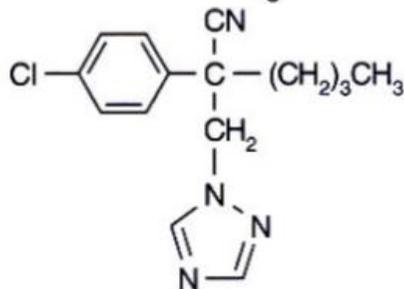
Imazaquim



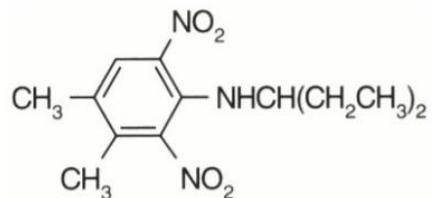
Metolacoloro



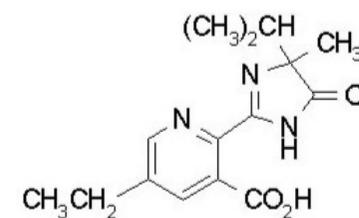
Miclobutanil



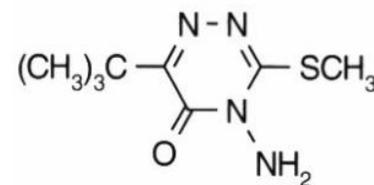
Pendimetalina



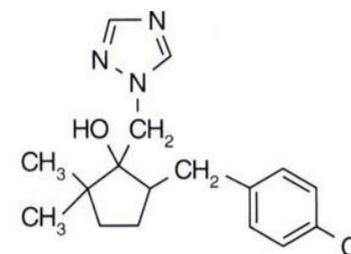
Imazetapir



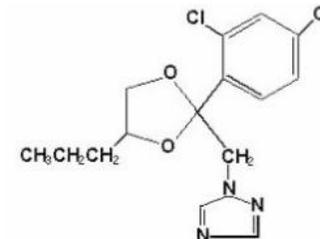
Metribuzim



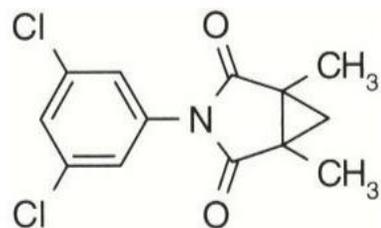
Metconazol



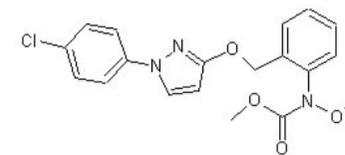
Propiconazol



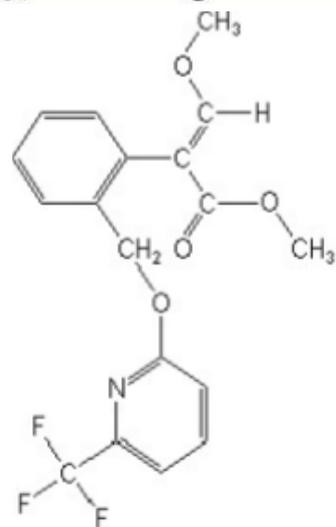
Procimidona



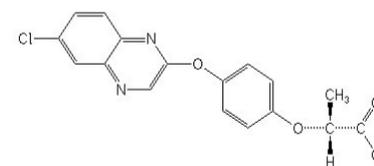
Piraclostrobina



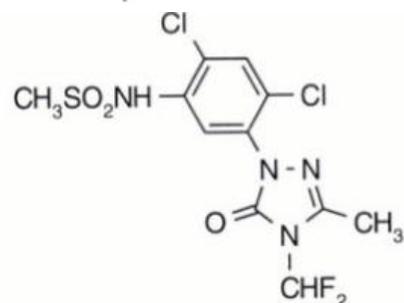
Picoxistrobina



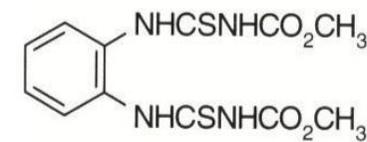
Quizalofop-P



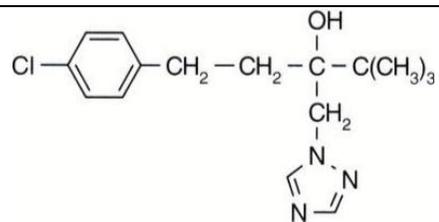
Sulfentrazona



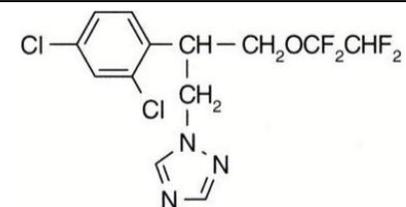
Tiofanato-metílico



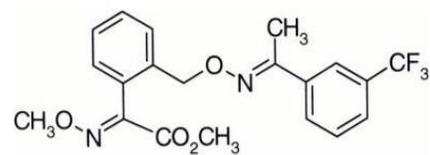
Tebuconazol



Tetraconazol



Trifloxistrobina



ANEXO 2

Superfícies de resposta dos agrotóxicos geradas por planejamento experimental

