

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CAMPUS URUGUAIANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ISADORA DIAS MARQUES

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO
MULTIRESÍDUO PARA PESTICIDAS EM EXTRATO DE SOJA UTILIZANDO
MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA E
CROMATOLOGRAFIA A GÁS ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS
(CG-EM)**

Uruguaiana, RS

2018

ISADORA DIAS MARQUES

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO
MULTIRESÍDUO PARA PESTICIDAS EM EXTRATO DE SOJA UTILIZANDO
MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA E
CROMATOGRAFIA A GÁS ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS
(CG-EM)**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Clésio Soldateli Paim
Coorientador: Prof. Dr. Elton Luis Gasparotto Denardin

Uruguaiiana, RS

2018

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais).

M357d Marques, Isadora Dias
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO
MULTIRESÍDUO PARA PESTICIDAS EM EXTRATO DE SOJA UTILIZANDO
MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA E CROMATOGRAFIA A GÁS
ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM) / Isadora Dias
Marques.
97 p.

Dissertação(Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa,
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, 2018.
"Orientação: Clésio Soldateli Paim".

1. Análise multiresíduo. 2. Cromatografia a gás. 3. Extrato
de soja. I. Título.

ISADORA DIAS MARQUES

Desenvolvimento e validação de método analítico multiresíduo para pesticidas em extrato de soja utilizando microextração líquido-líquido dispersiva e cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.

Dissertação defendida e aprovada em: 23 de março de 2018.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Clésio Soldateli Paim (UNIPAMPA)

Prof. Dr. Fávero Reisdorfer Paula (UNIPAMPA)

Prof. Dr. Rafael Roehrs (UNIPAMPA)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por tamanha fé, por renovar a cada momento a minha força e disposição, pelo discernimento concedido ao longo dessa jornada.

A todos meus familiares, mas principalmente aos meus pais, por serem o alicerce que me mantém firme e confiante, pelos valores regados a doçura, pelo amor incondicional que demonstram a mim, quero agradecer também aos meus irmãos, por estarem ao meu lado sempre que precisei, por acreditarem na irmã mais nova, e em especial à minha querida irmã Gisele, pelo carinho e apoio, e por ser um exemplo de profissional a ser seguido.

Ao meu querido namorado Yuri, companheiro e amigo, agradeço pelo apoio e amor dedicados a mim, tenho certeza que sem tua compreensão não me sentiria tão forte e confiante a seguir meus sonhos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Clésio, que acreditou em mim, que comigo partilhou seus conhecimentos e experiências, e que sempre me motivou. Quero agradecer pela amizade e acolhimento nos momentos de aflição. Quero expressar o meu reconhecimento e admiração pela sua competência profissional e minha gratidão eterna por todos os momentos em que conduziste a minha orientação.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Elton pelos conhecimentos partilhados e por estar sempre disponível para resolver quaisquer dúvidas que surgissem.

Aos professores Dr. Rafael e Dr. Fávero, por dispor de tempo para participar de minha banca examinadora, sei que suas contribuições serão valiosíssimas.

A minha querida amiga e irmã de alma, Maria Eduarda, que sempre se fez presente em minha vida, através de palavras de encorajamento e vivência pessoal, e pelos momentos de lazer que foram essenciais neste percurso onde rimos, choramos e nos ajudamos mutuamente.

Aos meus amigos e colegas do laboratório onde desenvolvi minha pesquisa. Não contendo a alegria ao sentir imensa gratidão, percebo que o sucesso de um trabalho depende da equipe que nos cerca e contribui para isso, e sem dúvidas vocês foram sensacionais. 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 na hora do café, mas agradeço principalmente pelo apoio, carinho e colo, quando as coisas pareciam não dar certo. Cada um de vocês dessa família que constitui, contribuiu de alguma forma para o meu crescimento profissional e pessoal, e de cada um de vocês eu obtive algum tipo de

aprendizado. Não tenho como deixar de agradecer especialmente ao Jefferson, a Dani, ao Murilo e ao Mateus, que me ajudaram diretamente durante a execução do trabalho, segurando as pontas quando eu me encontrava no limite e sempre dispostos a ensinar e a me ajudar. Vocês foram muito mais que colegas, foram amigos-irmãos no laboratório. Minha eterna gratidão! Ao pessoal que acompanharam toda a caminhada pelo lado de fora do laboratório, com quem pude construir amizades que levarei para a vida... Alisson, Jeff, Adriane, Gabriela e Andressa... Obrigada, obrigada, obrigada!

Aos demais professores do programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, funcionários da universidade e colegas que contribuíram para meu aprendizado acadêmico, agradeço pelas lições de vida essenciais na minha caminhada pessoal e profissional. Gratidão a todos que me acompanham nesta caminhada.

Resumo

A soja é um grão que além de possuir diversos benefícios funcionais origina produtos e subprodutos muito usados no ramo alimentício. Na alimentação humana a soja se destaca como alternativa de substituição para outros alimentos e por ser um alimento com alto teor de proteína e baixo custo. Em vista do aumento da utilização da soja e seus derivados na alimentação humana, torna-se importante a avaliação desses alimentos quanto à contaminação por resíduos de pesticidas. Nesse contexto, este estudo objetivou desenvolver um método simples de extração dos pesticidas da matriz do extrato de soja utilizando a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) e validar o método por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) para determinação quantitativa dos mesmos. Inicialmente, foram adicionados 5,0 mL de extrato de soja, cloreto de sódio (NaCl) e acetonitrila como agente de *salting-out* e solvente de extração, respectivamente. Após agitação manual, a mistura foi centrifugada e, na presença de cloreto de sódio, formou-se um sistema de duas fases: fase superior, acetonitrila contendo a mistura de pesticidas e fase inferior, fase aquosa contendo compostos solúveis e as proteínas precipitadas. Após a extração de pesticidas do extrato de soja, uma porção de fase sobrenadante (acetonitrila) foi removida, misturada com tetracloreto de carbono e injetada rapidamente por seringa em 5,0 mL de água ultrapurificada. Neste processo, os pesticidas foram extraídos em pequenas gotas de tetracloreto de carbono, utilizado como solvente de extração do processo. Após a centrifugação, as gotículas finas de tetracloreto de carbono foram sedimentadas no fundo do tubo de ensaio cônico. Posteriormente, a CG-EM foi utilizada para a separação e determinação de analitos na fase sedimentada. Parâmetros importantes para otimização da técnica DLLME foram avaliados como o tipo de solvente para extração, quantidade de sal e volume de solvente de extração, os quais afetam a eficiência de extração. Os resultados de validação foram satisfatórios, considerando que o método desenvolvido apresentou limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) de 0,170 µg/mL e 0,50 µg/mL, respectivamente, linearidade na faixa de 0,50 a 5,0 µg/mL, recuperações na faixa de 47 e 115%, com DPR inferior a 20% para níveis de fortificação entre 1,0 a 3,0 µg/mL, além de não sofrer influência da matriz, demonstrou-se seletivo, preciso e apresentou-se extremamente simples, rápido e de baixo custo.

Palavras-chave: extrato de soja, cromatografia a gás, pesticidas, DLLME.

Abstract

Soy is a grain that besides having several functional benefits originates products and by-products very used in the food industry. In human food, soybeans stand out as a substitute alternative for other foods and because it is a food with a high protein content and low cost. In view of the increased use of soy and its derivatives in human food, it is important to evaluate these foods for contamination by pesticide residues. In this context, this study aimed to develop a simple method to extract the pesticides from the soybean extract matrix using liquid-liquid dispersive microextraction (DLLME) and to validate the method by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) for quantitative determination of the same. Initially, 5.0 mL of soybean extract, sodium chloride (NaCl) and acetonitrile were added as a salting-out agent and extraction solvent, respectively. After manual stirring, the mixture was centrifuged and, in the presence of sodium chloride, a two-phase system was formed: upper phase, acetonitrile containing the pesticide mixture and lower phase, aqueous phase containing soluble compounds and precipitated proteins. After the extraction of pesticides from the soybean extract, a portion of supernatant phase (acetonitrile) was removed, mixed with carbon tetrachloride and rapidly injected via syringe into 5.0 mL of ultrapurified water. In this process, the pesticides were extracted in small drops of carbon tetrachloride, used as the extraction solvent of the process. After centrifugation, the fine carbon tetrachloride droplets were settled on the bottom of the conical test tube. Subsequently, CG-MS were used for the separation and determination of analytes in the sedimented phase. Important parameters for optimization of the DLLME technique were evaluated as the type of solvent for extraction, quantity of salt and volume of extraction solvent, which affect the extraction efficiency. The validation results were satisfactory considering that the optimized method presented a limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) of 0.170 $\mu\text{g/mL}$ and 0.500 $\mu\text{g/mL}$ respectively, linearity in the range of 0.50 to 5.0 $\mu\text{g/mL}$, recoveries in the range of 47 and 115%, with RSD of less than 20% for fortification levels between 1.0 and 3.0 $\mu\text{g/mL}$, besides not being influenced by the matrix, proving to be selective, precise and extremely simple, fast and low cost.

Keywords: soybean extract, gas chromatography, pesticides, DLLME.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Procedimento para realização da DLLME.....	27
Figura 2. Seleção do solvente extrator para recuperação dos pesticidas a partir do procedimento de DLLME.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição nutricional em 100 g de soja e bebidas à base de soja.....	15
Tabela 2. Composição nutricional do extrato de soja, dos leites de vaca e humano em cada 100 g.....	16
Tabela 3. Informações sobre os pesticidas estudados e Limites Máximos de Resíduos para grãos de soja.....	22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN – acetonitrila

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CG - Cromatografia a gás, do inglês Gas Chromatography

CG-EM – Cromatografia a gás acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês High Performance Liquid

CLAE-UV – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a ultravioleta

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento

CPE – Extração do ponto de nuvem, do inglês Cloud Point Extraction

DAD – Detector por Arranjo de Diodos, do inglês Diode Array Detector

DIC – Detector de Ionização de Chamas

Dispersion

DLLME – Microextração líquido-líquido dispersiva, do inglês Dispersive liquid-liquid microextraction

DPR – Desvio Padrão Relativo, do inglês Relative Standard Deviation

ECD – Detector por Captura de Elétrons, do inglês Electron Capture Detector

EI – Impacto eletrônico, do inglês electronic impact

EM – Efeito matriz

EM – Espectrometria de Massas, do inglês Mass Spectrometry

EM/EM – Espectrometria de Massas em série, do inglês Mass Spectrometry in

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

ES – Extrato de soja

eV – Elétrons volt

FPD - Fotometria de chama, do inglês Flame Photometric Detection

IDA – Ingestão Diária Aceitável

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

kcal – Quilocaloria

LD – Limite de Detecção, do inglês Limit of Detection

LMR – Limite Máximo de Resíduo

LQ – 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

MIC – Corrente de Íons Monitorados, do inglês Monitored Ion Current

MS – Ministério da Saúde

MSPD – Dispersão da Matriz em Fase Sólida, do inglês Matrix Solid Phase

NaCl – Cloreto de sódio

NPD – Detector de Nitrogênio e Fósforo, do inglês Nitrogen Phosphorus Detector

PARA - Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos

Performance Liquid Chromatography

pH – Potencial Hidrogeniônico

PI – Padrão Interno

PNCRC – Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes

QuEChERS – Rápido, fácil, econômico, robusto e seguro, do inglês Quick, Easy, Cheap, Rugged and Safe

r – Coeficiente de Correlação

r^2 – Coeficiente de Determinação

SAECP – Solução de Acetonitrila Extratora Contendo os Pesticidas

S/R – Sinal/ruído

SBSE - extração sortiva em barra magnética, do inglês Stir Bar Sorptive Extraction

SFE - Extração por Fluido Supercrítico, do inglês Supercritical Fluid Extraction

SIM – Monitoramento de Íons Seleccionadas, do inglês Selected Ion Monitoring

SPE – Extração em Fase Sólida, do inglês Solid Phase Extraction

SPME – Microextração em Fase Sólida, do inglês Solid Phase Micro Extraction

tandem

TIC – Cromatograma do Íon Total, do inglês Total Ion Chromatogram

t_R – Tempo de retenção

UHPLC – Cromatografia líquida de ultra eficiência, do inglês Ultra High

Sumário

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	13
2.1	Geral.....	13
2.2	Objetivos específicos.....	13
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1	Soja: Importância econômica, agrícola e nutricional.....	14
3.2	Extrato de soja.....	15
3.3	Pesticidas.....	18
3.4	Tipos de pesticidas.....	19
3.5	Toxicidade.....	23
3.6	Análise de pesticidas.....	23
3.7	Métodos de extração.....	24
3.8	Cromatografia a gás.....	31
3.9	Análise de pesticidas por Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM).....	31
3.10	Validação do método cromatográfico.....	33
3.10.1	Especificidade – Efeito matriz.....	34
3.10.2	Curva analítica e linearidade.....	36
3.10.3	Precisão.....	36
3.10.4	Exatidão.....	37
3.10.5	Limite de detecção (LD).....	38
3.10.6	Limite de quantificação (LQ).....	38
4	METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÕES	39
5	ARTIGO	40
6	DISCUSSÃO GERAL	57
7	CONCLUSÃO	63
8	PERSPECTIVAS	64
9	REFERÊNCIAS	65
10	ANEXOS	77

1 INTRODUÇÃO

O extrato de soja é um alimento rico em proteínas de alto valor biológico, não contém colesterol ou lactose (IÇIER *et al.*, 2015), sendo muitas vezes recomendado como alternativa ao consumo de leite bovino. Este produto possui também isoflavonas, flavonóides classificados como fitoestrógenos devido às suas atividades semelhantes a estrogênio. A literatura relata uma série de atividades funcionais dos benefícios das isoflavonas, incluindo atividade anticancerígena, prevenção de doenças cardiovasculares, melhoria da saúde óssea e atividades antioxidantes (CHUNG *et al.*, 2000; OSOSKI & KENNELLY, 2003; IKEDA *et al.*, 2006;).

As bebidas à base de soja representam uma alternativa de alimentação com diversos benefícios à saúde humana, no entanto, apesar dos benefícios do seu consumo, elas podem conter resíduos de pesticidas aplicados em soja para controle de pragas e doenças. Elevados níveis de pesticidas residuais nos alimentos podem resultar em efeitos adversos para a saúde humana e várias patologias como câncer, doenças neurodegenerativas ou distúrbios reprodutivos são suspeitos de serem relacionadas à exposição a pesticidas (GOLD *et al.*, 2001; YARITA *et al.*, 2014; NOUGADÈRE *et al.*, 2014).

Devido à toxicidade dos pesticidas e para garantir práticas agrícolas adequadas, vários países estabeleceram um limite máximo de resíduo (LMR) nos alimentos para uma gama de pesticidas. No Brasil, os LMR são estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). A produção de soja requer grandes quantidades de pesticidas e não há legislação atual que estabeleça LMR para resíduos de pesticidas em bebidas à base de soja, dificultando o controle do uso indiscriminado desses compostos e a preservação da saúde (ANVISA, 2015).

A preparação de amostras para a análise multirresíduo é normalmente necessária para isolar e concentrar compostos de interesse da matriz antes da análise cromatográfica (MATSADIQ *et al.*, 2011). A determinação de resíduos de pesticidas em matrizes de alimentos é um desafio devido à baixa concentração de analitos e composição de matrizes, as quais são complexas na maioria dos casos (RIZZETTI *et al.*, 2016).

Nos últimos anos, os esforços foram direcionados para a miniaturização do procedimento de extração, com o intuito de reduzir significativamente o volume de solvente de extração. Diante disso, a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) pode ser

usada como alternativa às etapas de extração e limpeza para amostras complexas (DANESHFAR *et al*, 2009).

A DLLME foi introduzida por Assadi e colaboradores para a determinação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (REZAEI *et al*, 2006). Baseia-se no sistema de solventes dos componentes ternais, como o LLE homogêneo (HLLE) e a extração do ponto de nuvem (CPE), incluindo solvente de extração, solvente dispersivo e amostra aquosa contendo o analito de interesse. Possui vantagens de alto fator de enriquecimento (FE), alta recuperação, baixo custo, simplicidade, rapidez, baixo consumo de solventes e operação fácil (REZAEI *et al.*, 2010).

A utilização de pesticidas sistêmicos tem aumentado a preocupação com relação à poluição do lençol freático, contaminação de solos, existência de resíduos químicos em alimentos, contaminação de água potável, aumento dos casos de suicídios e intoxicações por substâncias químicas e poluentes orgânicos persistentes (MMA, 2003).

Diante do uso intensificado de pesticidas na cultura de soja e considerando o aumento da utilização da soja e seus derivados na alimentação humana, torna-se importante a avaliação desses alimentos quanto à contaminação de resíduos de pesticidas, visto que não há limite estabelecido para essas substâncias no extrato de soja, assim, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação residual destes pesticidas presentes no extrato de soja.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Desenvolver e validar um método para determinação quantitativa de pesticidas em extrato de soja utilizando a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) e a cromatografia a gás com detecção por espectrometria de massas (CG-EM).

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar o método de extração líquido-líquido dispersiva (DLLME) para extrair diferentes classes de pesticidas da matriz de extrato de soja;
- Desenvolver e validar método analítico por cromatografia a gás utilizando detecção por espectrometria de massas para determinação quantitativa dos pesticidas em estudo nas matrizes de extrato de soja.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Soja: Importância econômica, agrícola e nutricional

A soja (*Glycine max (L.) Merrill*) é uma leguminosa de origem chinesa produzida há mais de cinco mil anos. A soja que é cultivada atualmente é muito diferente dos seus ancestrais, a qual era uma planta rasteira que a partir de cruzamentos naturais entre duas espécies de soja selvagem, foram domesticadas e melhoradas por cientistas e se tornaram uma planta herbácea (DALL'AGNOL *et al.*, 2007).

No Brasil, os primeiros materiais genéticos do grão foram trazidos em 1882 dos Estados Unidos (EUA) e cultivados na Bahia, no entanto, a cultura não apresentou êxito devido às condições climáticas. Logo, em 1900, a soja foi cultivada 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).

No momento atual, 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, atrás apenas dos EUA. Na safra 2016/2017, a cultura ocupou uma área de 33,89 milhões de hectares, o que totalizou uma produção de 113,923 milhões de toneladas. A produtividade média da soja brasileira foi de 3.362 kg por hectare (CONAB, 2017). 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.

Estudos sugerem 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), a efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes, protegendo o organismo contra danos causados por radicais livres (DURANTI, 2006).

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.

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

Componentes	Soja	Bebidas à base de soja
Água (g)	8,54	75,82
Energia (Kcal)	446	101
Proteínas (g)	36,49	4,22
Gorduras totais (g)	19,94	1,66
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
Cálcio (mg)	277	127
Ferro (mg)	15,7	1,9
Magnésio (mg)	280	42
Fósforo (mg)	704	127
Potássio (mg)	1797	245
Sódio (mg)	2	63
Zinco (mg)	4,89	1,9
Cobre (mg)	1,658	0,211
Manganês (mg)	2,517	14,768
Selênio	17,8	7,4
Ácidos graxos totais saturados (g)	2,884	0,422
Ácidos graxos totais monoinsaturados (g)	4,404	1,154
Ácidos graxos totais poli-insaturados (g)	11,255	0,057
Ácidos graxos totais trans (g)	0	0
Fitoesterol (mg)	151	-

Fonte: Departamento de Agricultura dos Estados Unidos - USDA (2015).

3.2 Extrato de soja

O extrato de soja, talvez, tenha sido elaborado pela primeira vez na China durante o século II a.C. (LIU,1999). Desde então, passou a ser consumido neste país, e com decorrer do

tempo expandiu-se para o resto do mundo. O extrato proteico ou "leite" é o produto obtido por extração aquosa dos sólidos solúveis dos grãos de soja, o qual consiste de uma suspensão de proteínas e de carboidratos, de uma emulsão de lipídeos e de uma solução de alguns minerais. O extrato de soja é altamente nutritivo e muito se compara ao leite bovino e humano em valores nutricionais (Tabela 2). Contém maiores quantidades em ferro, ácidos graxos insaturados e niacina, menores quantidades em gordura e cálcio e ausência de lactose e colesterol (LIU, 1999).

Tabela 2. Composição nutricional do extrato de soja, dos leites de vaca e humano em cada 100 g.

Componentes	Extrato de soja	Leite de vaca	Leite humano
Água (g)	91,8	88,5	88,2
Proteína (g)	3,0	3,6	1,4
Gordura (g)	1,4	3,0	3,1
Carboidrato (g)	3,8	4,9	7,1
Cinza (g)	0,5	0,7	0,2
Energia (Kcal)	38	61	61,9
Cálcio (mg)	15	123	35
Fósforo (mg)	30	96	25
Ferro (mg)	0,4	0,1	0,2
Tiamina (mg)	0,05	0,04	0,02
Riboflavina (mg)	0,04	0,18	0,03
Niacina (mg)	0,5	0,1	0,2
Ácidos graxos saturados (g)	40-48	60-70	55
Ácidos graxos insaturados (g)	52-60	30-40	45
Colesterol	0	9-10	9-19

Fonte: DUTRA DE OLIVEIRA (1982), LIU (1999).

Nutricionalmente, o extrato de soja apresenta 1,7% de lipídios, 4,2% de proteínas, 8,4% de açúcares, 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 (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 lipídios por eliminação de radicais livres, que são potenciais causadores de diversas doenças (ANDRÉS *et al.*, 2014).

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).

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).

As bebidas à base de soja são feitas a partir do extrato de soja que é obtido por meio da moagem dos grãos de soja com água, processo no qual há preservação das proteínas, parte dos carboidratos solúveis, gorduras insaturadas, vitaminas e minerais presentes no grão (CALLOU, 2009). No primeiro momento há a limpeza e seleção dos grãos, sendo este, um dos passos mais importantes para a produção de um extrato de qualidade, pois elimina os sabores e odores desagradáveis, além de reduzir a carga microbiana associada à presença de materiais estranhos. Posteriormente, 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 (*slurry*) e sem atividade enzimática, composta por fibras e leite de soja. Logo, 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).

As bebidas à base de soja trazem diversos benefícios à saúde humana, entretanto, devido ao seu processo de produção, além dos compostos saudáveis, podem conter resíduos de pesticidas 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 pesticidas em bebidas à base de soja, dificultando assim o controle do uso indiscriminado desses compostos e preservação da saúde da população.

3.3 Pesticidas

O *Codex Alimentarius* define pesticida como sendo toda e qualquer substância utilizada com o propósito de prevenir, destruir, atrair, repelir ou controlar qualquer peste, incluindo espécies indesejáveis de plantas, insetos ou animais, durante as etapas de produção, armazenamento, transporte, distribuição e processamento do alimento ou ração animal (ou que seja fornecido aos animais para controle de ectoparasitas). O termo inclui substâncias utilizadas como reguladoras do crescimento das plantas, desfolhantes, dessecantes, ou inibidores de brotos, e substâncias aplicadas tanto antes como após a colheita, para proteger a mesma da deterioração durante o armazenamento e transporte (FAO, 2005).

A lei dos agrotóxicos (BRASIL, 1989) e o decreto que regulamenta esta lei (BRASIL, 2002) definem que essas substâncias são: “os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos”.

No Brasil, eles precisam ser registrados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Existe ainda o Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT) um banco de dados para consulta

pública sobre pragas, ingredientes ativos, produtos formulados, relatórios e componentes de fórmulas registrados no Ministério da Agricultura, com informações dos Ministérios da Saúde e do Meio Ambiente (MAPA, 2015).

3.4 Tipos de pesticidas

Segundo dados da ANVISA (2012), os herbicidas, representam 45% do total de pesticidas comercializados, os fungicidas respondem por 14%, os inseticidas 12% e as demais categorias de pesticidas 29%.

A classificação dos pesticidas constitui tema de discussão, pois inúmeras denominações têm sido empregadas para determinar sua ação: defensivos agrícolas, biocidas, pesticidas, praguicidas e agrotóxicos. Conforme a Legislação Brasileira, tais compostos são denominados de “agrotóxicos” e classificados como inseticidas, fungicidas e herbicidas.

A denominação pesticida é dada à substância ou à mistura de substâncias destinadas a prevenir a ação ou destruir direta e indiretamente insetos, ácaros, roedores, ervas daninhas, bactérias e outras formas de vida animal ou vegetal prejudiciais à lavoura (SANCHES, 2003). Levando em consideração isto, os pesticidas podem ser classificados quanto à finalidade (aficida, ovicida, larvicida, raticida, formicida, acaricida, inseticida, entre outros) e quanto ao modo de ação (ingestão, contato, microbiano e fumegante) sendo possível o enquadramento em mais de uma classe. Quanto à origem, a divisão envolve os compostos inorgânicos (compostos de mercúrio, bário, enxofre e cobre), os pesticidas de origem vegetal, bacteriana e fúngica (piretrinos, antibióticos e fitocidas) e os pesticidas orgânicos.

Os pesticidas orgânicos constituem o maior grupo de produtos com alta atividade fisiológica. As principais classes desses compostos são os organoclorados (OC) e os organofosforados (OF). Os organoclorados apresentam em sua estrutura átomos de carbono e cloro e surgiram comercialmente na década de 40. São lipossolúveis, ou seja, podem se acumular na parte gordurosa de organismos vivos. Esses compostos são resistentes à hidrólise, entretanto sofrem reações fotoquímicas formando derivados com estabilidade e toxicidade similares ou até maiores do que as dos compostos de origem. Muitos organoclorados são proibidos, mas têm sido aplicados como inseticidas em várias culturas (SANCHES, 2003). Os pesticidas organofosforados constituem uma classe importante de inseticida usado atualmente no combate a diversos tipos de pragas na agricultura. São

compostos orgânicos derivados do ácido fosfórico, do ácido tiofosfórico ou do ácido ditiofosfórico que agem com a finalidade do extermínio de pragas.

Assim, considerando a grande diversidade de produtos, existem cerca de 300 princípios ativos em duas mil formulações comerciais diferentes no Brasil, sabendo-se disso é importante conhecer a classificação dos agrotóxicos quanto à sua ação e ao grupo químico a que pertencem (MS, 2009):

a) Inseticidas, possuem ação de combate a insetos, larvas e formigas. Pertencem a quatro grupos químicos distintos:

- Organofosforados: são compostos orgânicos derivados do ácido fosfórico, do ácido tiofosfórico ou do ácido ditiofosfórico. Ex.: Folidol[®], Azodrin, Malation, Diazinon, Nuvacron[®], Tamaron[®], Rhodiatox[®].
- Carbamatos: são derivados do ácido carbâmico. Ex.: Carbaril, Temik[®], Zectram[®], Furadan[®].
- Organoclorados: são compostos à base de carbono, com grupamentos de cloro. São derivados do clorobenzeno, do ciclo-hexano ou do ciclodieno. Foram muito utilizados na agricultura, como inseticidas, porém seu emprego tem sido progressivamente restringido ou mesmo proibido. Ex.: Aldrin, Endrin, BHC, DDT, Endossulfan, Heptacloro, Lindane, Mirex[®].
- Piretróides: são compostos sintéticos que apresentam estruturas semelhantes à piretrina, substância existente nas flores do *Chrysanthemum* (Pyrethrum) *Cinerialfolium*. Alguns desses compostos são: aletrina, resmetrina, decametrina, cipermetrina e fenpropanato. Ex.: Decis[®], Protector[®], K-Otrine[®], SBP[®].

b) Herbicidas: combatem ervas daninhas. Nas últimas duas décadas, esse grupo tem tido uma utilização crescente na agricultura. Seus principais representantes são: Paraquat, comercializado com o nome de Gramoxone[®]; glifosato, conhecido comumente pelo nome comercial Round-up[®]; Pentaclorofenol, PCF; derivados do ácido fenoxiacético, 2,4 diclorofenoxiacético (2,4 D) e 2,4,5 triclofenoxiacético (2,4,5 T); a mistura entre 2,4 D e 2,4,5 T representa o principal componente do agente laranja, utilizado como desfolhante na Guerra do Vietnã. O nome comercial dessa mistura é conhecido como Tordon[®] e os dinitrofenóis, Dinoseb[®], DNOC.

c) Fungicidas: combatem fungos. Atualmente há diversos fungicidas disponíveis no mercado. Os principais grupos são: etileno-bis-ditiocarbonatos, trifenil estânico, hexaclorobenzeno, compostos mercuriais e O-etil-S, S-difenilditiofosfato.

Outros grupos importantes (SANCHES, 2003; ANVISA, 2017) são:

Rodenticidas (dicumarínicos): utilizados no combate a roedores;

Acaricidas: ação de combate a ácaros diversos;

Nematicidas: ação de combate a nematoides; moluscicidas: ação de combate a moluscos, basicamente contra o caramujo da esquistossomose;

Fundigantes: ação de combate a insetos, bactérias, fosfatos metálicos (fosfina) e brometo de metila; escorpionicidas: utilizado no combate aos escorpiões e vampiricidas: ação de combate aos morcegos.

Os pesticidas elencados para o estudo estão descritos na tabela abaixo (Tabela 3) e suas fórmulas estruturais estão apresentadas no Anexo 1.

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

Pesticida	Fórmula química	Classe	Grupo químico	LMR (mg kg ⁻¹)
1H-1,2,4-triazole	C ₂ H ₃ N ₃	Fungicida	Triazol	-
1H-1,2,4-triazole-1-ethanol	C ₄ H ₇ N ₃ O	Fungicida	Triazol	-
Triadimenol	C ₁₄ H ₁₈ ClN ₃ O ₂	Fungicida	Triazol	-
Nuarimol	C ₁₇ H ₁₂ ClFN ₂ O	Fungicida/Inseticida	Pirimidina, clorado, fluorado	-
Furathiocarb	C ₁₈ H ₂₆ N ₂ O ₅ S	Inseticida	Metilcarbamato de benzofuranila	-
Alachlor	C ₁₄ H ₂₀ ClNO ₂	Herbicida	Cloroacetanilida	0,05
Azinphos-ethyl	C ₁₂ H ₁₆ N ₃ O ₃ PS ₂	Inseticida	Organofosforado	-
Benthiocarb	C ₁₂ H ₁₆ ClNOS	Herbicida	Tiocarbamato	-
Oxyfluorfen	C ₁₅ H ₁₁ ClF ₃ NO ₄	Herbicida	Difenil éter	0,05
Carbofurane	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃	Inseticida	Metilcarbamato de benzofuranila	-
Carbophenothion	C ₁₁ H ₁₆ ClO ₂ PS ₃	Inseticida/Acaricida	Organofosforado	-
Diazinone	C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O ₃ PS	Inseticida	Organofosforado	-
Disulfoton	C ₈ H ₁₉ O ₂ PS ₃	Inseticida/Acaricida	Organofosforado	-
Ethion	C ₉ H ₂₂ O ₄ P ₂ S ₄	Inseticida	Organofosforado	-
Flusilazole	C ₁₆ H ₁₅ F ₂ N ₃ Si	Fungicida	Triazol	0,01
Kresoxim-methyl	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	Fungicida	Estrobilurina	0,05
Myclobutanil	C ₁₅ H ₁₇ ClN ₄	Fungicida	Triazol	0,02
Parathion	C ₁₀ H ₁₄ NO ₅ PS	Inseticida/Acaricida	Organofosforado	0,1
Penconazole	C ₁₃ H ₁₅ Cl ₂ N ₃	Fungicida	Triazol	-
Phorate	C ₇ H ₁₇ O ₂ PS ₃	Inseticida/Acaricida	Organofosforado	-
Chlorpyrifos-ethyl	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS	Inseticida/Acaricida	Organofosforado	0,01
Fluazifop-p-butyl	C ₁₉ H ₂₀ F ₃ NO ₄	Herbicida	Ácido ariloxifenoxipropiônico	-
Pyridaben	C ₁₉ H ₂₅ ClN ₂ OS	Inseticida/Acaricida	Piridazinona	-
Pyriproxyfen	C ₂₀ H ₁₉ NO ₃	Inseticida	Éter piridiloxipropílico	0,05
Tebuconazole	C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃ O	Fungicida	Triazol	0,1
Triazophos	C ₁₂ H ₁₆ N ₃ O ₃ PS	Inseticida/Acaricida	Organofosforado	-

Fonte: ANVISA*

3.5 Toxicidade

Os pesticidas são classificados em quatro classes toxicológicas, sendo esta classificação baseada na identificação do componente de risco referente a uma substância química e diferencia a toxicidade dos pesticidas, com base no ingrediente ativo e sua formulação. As toxicidades aguda oral, dérmica (Dose letal - DL50) e inalatória (Concentração letal - CL50) para ratos em relação aos pesticidas foram o princípio fundamental da classificação, sendo que valores de DL50 dérmica tiveram uma forma de classificação mais rígida do que os valores da DL50 oral (SANCHES, 2003; OMS, 2009). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) pode-se observar que produtos idênticos se distinguem na classificação de acordo com a sua formulação, sendo considerados mais tóxicos os produtos na forma de sólidos. É importante salientar que a classificação toxicológica de uma substância ou formulação não depende de todos os dados toxicológicos estarem na mesma classe, o produto será classificado segundo o dado mais agravante (SANCHES, 2003; OMS, 2009).

Os riscos tóxicos não se limitam apenas ao produtor rural que possui contato direto aos pesticidas, mas também ao meio ambiente e alimentos. No Brasil, as formulações de pesticidas são obrigadas a apresentar no rótulo a cor correspondente à classe de sua toxicidade. Os pesticidas estão divididos em quatro classes toxicológicas:

- I= Rótulo vermelho (extremamente tóxico);
- II= Rótulo amarelo (altamente tóxico);
- III= Rótulo azul (medianamente tóxico);
- IV= Rótulo verde (pouco tóxicos).

3.6 Análise de pesticidas

Os pesticidas desempenham um importante papel no crescimento da agricultura moderna. Diante disso, a preocupação com a saúde humana e segurança alimentar, estimulou o desenvolvimento de vários métodos analíticos aplicados à determinação qualitativa e quantitativa de resíduos de pesticidas em diferentes tipos de alimentos (PANG *et al.*, 2006).

Com o intuito de evitar ou diminuir episódios de intoxicações causadas por pesticidas, 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 regulatórias 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 uso de pesticidas durante e pós-cultivo (ANVISA, 2015).

Devido a algumas propriedades destes compostos químicos, há a necessidade de um pré-tratamento das amostras a fim de possibilitar uma melhor eliminação de substâncias interferentes, bem como permitir a concentração de alguns analitos em baixos níveis presentes em matrizes complexas (BRUZZONITI *et al.*, 2000).

3.7 Métodos de extração

A preparação da amostra é uma etapa crucial no processo analítico, pois demanda maior tempo de execução e custos, além de ser muito propensa a erros. Esta etapa é responsável pela extração e enriquecimento dos analitos de interesse, além da remoção de componentes da matriz que podem causar interferência nos resultados, sendo extremamente importante na análise de alimentos, os quais são matrizes complexas e podem possuir resíduos em níveis traço (WANG *et al.*, 2015).

O primeiro método multirresíduo para análise de pesticidas em alimentos foi desenvolvido por Mills e colaboradores na década de 1960, nos laboratórios do U.S. *Food and Drug Administration* (FDA) (MILLS, *et al.* 1963) e utilizava acetonitrila para extração com posterior partição utilizando solventes apolares. Com o desenvolvimento de novos

pesticidas, com características mais polares, fizeram-se necessárias novas técnicas de extração para análise destes tipos de compostos (PRESTES *et al.*, 2009).

Entretanto, essas técnicas podem ser demoradas, complicadas, trabalhosas e envolvem muito custo, além da demanda de elevados volumes de solvente, os quais 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). 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 (GOLGE & KABAK, 2015).

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, como por exemplo o extrato de soja, 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 coextrativos que possam interferir na análise. Segundo Gilbert-López e colaboradores (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 coextrativos, 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 minimização 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 e colaboradores propuseram um método multirresíduo 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 pesticidas em amostras de alimentos, inclusive este vem sendo o mais utilizado para matrizes de produtos oriundos da soja, tendo sido expandido para grande variedade de analitos e compostos (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; PRESTES *et al.*, 2009; GONZÁLEZ-CURBELO *et al.*, 2015).

Uma alternativa a estas técnicas citadas é a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME). Esta técnica de microextração, desenvolvida por Rezaee e colaboradores (2006) para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em amostras de água é muito bem aplicada a amostras aquosas. O processo envolve a partição dos analitos entre duas fases líquidas imiscíveis, onde a fase orgânica é composta por uma mistura de solventes dispersor e extrator.

A Figura 1 mostra o procedimento para a realização deste procedimento. O solvente extrator e o solvente dispersor são injetados rapidamente na amostra aquosa com o auxílio de uma microseringa (A). A injeção da mistura forma uma solução turva (B). Após a centrifugação, as gotículas do solvente extrator se depositam no fundo do tubo (C) e são retiradas com uma microseringa (D) para posterior análise (E) (REZAAEE, *et al.*, 2006; KOCUROVA, *et al.*, 2012).

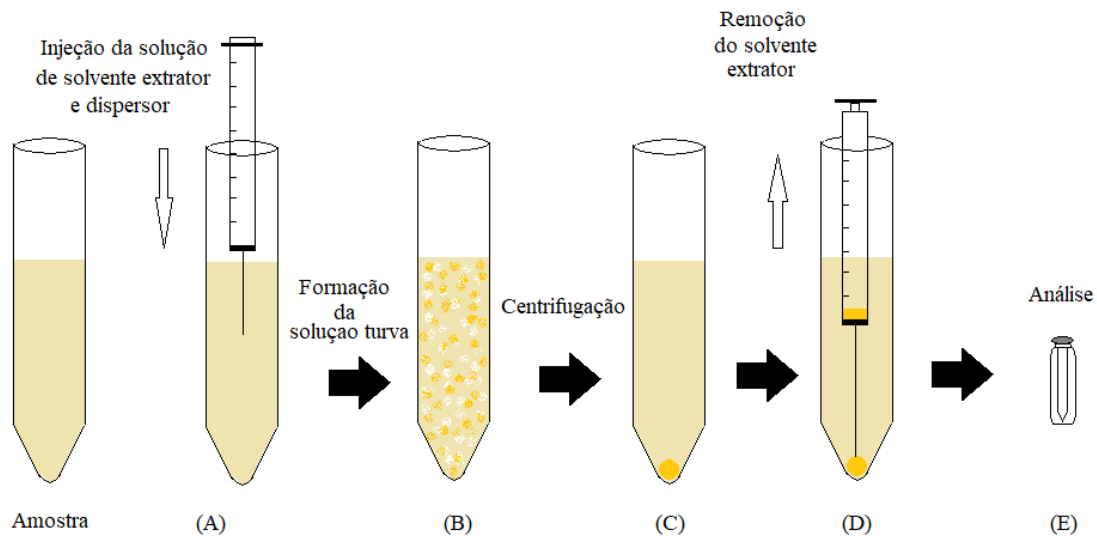


Figura 1. Procedimento para realização da DLLME (Fonte: Adaptado de Moreira et al., 2014).

A DLLME apresenta como vantagens na miniaturização do sistema de extração: baixo tempo de extração, simplicidade de operação, rapidez, baixo custo, alta recuperação do analito e alto fator de enriquecimento (MOREIRA, 2014). É também considerada altamente seletiva para as mais variadas aplicações (SARAFRAZ-YAZDI *et al.*, 2010).

A técnica possui como desvantagens o uso de solventes tóxicos (ALSHANA, *et al.*, 2013), o processo de extração manual e a centrifugação que limita o volume de amostra a ser utilizado, o que também demanda maior tempo no processo (LIANG, *et al.*, 2008; REZAEI, *et al.*, 2008) e dificulta a automação da técnica (CRUZ-VERA, *et al.*, 2009).

O processo de extração por DLLME é influenciado por alguns parâmetros, entre os quais volume e tipo de solvente extrator e de solvente dispersor, tempo de extração, força iônica e pH (CALDAS, *et al.*, 2011).

A seleção de um solvente extrator apropriado é o parâmetro mais importante na DLLME. O solvente extrator deve ser selecionado dentre os que apresentarem maior densidade que a água, capacidade de extração dos compostos de interesse e bom comportamento cromatográfico. Na extração de pesticidas em águas por DLLME, os solventes extratores mais utilizados são os clorados, entre eles se destacam clorobenzeno (NAGARAJU & HUANG, 2007), tetracloreto de carbono (BIRJANDI, *et al.*, 2008) e tetracloroetileno (REZAEI, *et al.*, 2006).

Em DLLME, o volume do solvente extrator deve ser o menor possível, mas suficiente para extrair o analito, obtendo-se assim um alto fator de enriquecimento. Os volumes utilizados para extração de pesticidas variam entre 15,0 e 116,0 μL . Para a escolha do solvente dispersor, a principal característica a ser considerada é a sua miscibilidade na fase orgânica (solvente extrator) e na fase aquosa (REZAE, *et al.*, 2006). A necessidade destas características limita, geralmente, ao uso de metanol, acetonitrila, acetona e tetra-hidrofurano (THF). A variação no volume de solvente dispersor influencia no volume de fase sedimentada, então, é possível considerar a influência do solvente dispersor na eficiência da extração (REZAE, *et al.*, 2006). Os solventes mais utilizados como dispersores nos estudos com pesticidas são a acetonitrila e o metanol, variando o volume entre 500,0 e 2000,0 μL .

A injeção, com o auxílio de uma seringa, da mistura dos solventes extrator e dispersor na amostra é recomendada por Rezae e colaboradores (2006), pois quando o dispersor e o extrator são adicionados separadamente na amostra aquosa, não se observa a formação de uma fase sedimentada.

A influência da força iônica também deve ser considerada, uma vez que influencia na separação das fases. O aumento na concentração de NaCl aumenta o volume de fase sedimentada, devido à diminuição da solubilidade do solvente extrator na presença deste sal. Esta influência será de acordo com as características de cada analito, observando-se uma grande variação na concentração adicionada de NaCl (0,0 a 10%) de acordo com a literatura (FARAHANI, *et al.*, 2007).

Outro parâmetro que deve ser levado em consideração é o pH, o qual deve ser otimizado em função da acidez ou basicidade dos compostos. Compostos ácidos normalmente requerem uma acidificação da amostra para permanecerem na forma molecular e facilitar a partição dos analitos nas microgotas do solvente extrator. A acidificação é empregada, por exemplo, quando se trabalha com compostos da classe dos clorofenoxiacéticos (CALDAS, 2011).

O tempo de extração na DLLME também deve ser otimizado e é definido como o intervalo entre a injeção da mistura dos solventes extrator e dispersor na fase aquosa e a centrifugação. Rezae e colaboradores (2006) examinaram o tempo de extração entre 0 e 60 min para a extração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em amostras de águas e concluíram que o tempo de extração deve ser muito rápido. Isso pode ser explicado devido à elevada área superficial entre o solvente extrator e a amostra, como foi confirmado por

microscopia ótica. Isso comprova que a transferência dos analitos para a fase orgânica é rápida, sendo o estado de equilíbrio atingido quase que instantaneamente, resultando em um tempo de extração muito curto. Isto também foi comprovado em outros estudos, como no realizado por Nagaraju e Huang (2007).

Nessa técnica, o equilíbrio é atingido imediatamente e a etapa que consome mais tempo é a centrifugação. A centrifugação na DLLME é essencial para que se obtenham duas fases distinguíveis nos tubos de extração (GARCÍA-LÓPEZ, *et al.*, 2007). Depois da retirada da fase sedimentada, esta pode ser injetada diretamente no equipamento ou evaporada e redissolvida em um solvente apropriado. Normalmente em trabalhos com cromatografia líquida em fase reversa, quando são utilizados solventes extratores, tal como tetracloreto de carbono, é necessária a mudança de solvente. Este procedimento foi adotado por Farajzadeh e colaboradores (2007), pois o tetracloreto de carbono não apresentou um bom comportamento cromatográfico, causando alargamento dos picos e aumento do ruído. Neste processo a fase sedimentada foi evaporada em banho-maria e os analitos redissolvidos em 50,0 µL de metanol.

O método DLLME apresenta praticidade, versatilidade e baixo custo, sendo estas as principais características que o tornaram o método de escolha para análise multirresíduo no extrato de soja.

Alguns estudos que utilizaram a técnica de DLLME e utilizaram amostras semelhantes a este estudo foram descritos abaixo.

Farajzadeh *et al.* (2011) usaram DLLME para extração e pré-concentração de pesticidas de triazol a partir de amostras de leite de vaca, usando CG acoplada a detector de ionização de chama (DIC) e CG-EM para quantificar os analitos. As proteínas foram precipitadas usando acetonitrila e cloreto de sódio e os pesticidas foram previamente concentrados em cerca de 1,0 mL do sobrenadante de acetonitrila e 40,0 µL de clorofórmio, injetando rapidamente a mistura em 5 mL de água desionizada. Após uma centrifugação de 5 minutos a 4000 rpm, foram alcançados fatores de enriquecimento de 156 (penconazol), 166 (hexaconazol), 180 (tebuconazol), 243 (triticonazol) e 387 (difenconazol). O intervalo linear foi 20,0 a 80,0 µg/L para penconazol e hexaconazol e o menor valor LD registrado foi de 4 µg/L para hexaconazol.

Liu e colaboradores (2011) combinaram SPE e DLLME para permitir a determinação quantitativa de 14 diferentes difenilos policlorados (PCDEs) e difenil éteres polibromados

(PBDEs) em leite usando CG-EM. Para precipitar proteínas, uma solução de NaOH 50% e acetona foram adicionados e as amostras foram aquecidas a 70 °C em banho-maria. Posteriormente, os analitos foram extraídos em 5,0 mL de hexano, dessecados em sulfato de sódio anidro e concentrados até 2,0 mL por evaporação antes de serem transferidos para a coluna SPE. As frações da SPE foram secas e reconstituídas em 1,0 mL de acetona, o qual foi usado como solvente dispersivo no procedimento DLLME otimizado. O clorobenzeno (19,0 µL) foi misturado com o solvente dispersivo e foi rapidamente injetado em 5,0 mL de água MilliQ. O procedimento SPE-DLLME desenvolvido mostrou-se eficaz, pois não foi verificado impacto significativo na eficiência de extração. O método apresentou valores adequados de exatidão e precisão para difenilos policlorados (recuperação: 100,0 - 131,8%; precisão: 3,20 - 10,20%) e éteres difenílicos polibromados (recuperação: 74,0-93,6%; 1,12-12,34%).

Em 2014, Arroyo-Manzanares e colaboradores utilizou DLLME tradicional para a determinação de várias sulfonamidas no leite. A análise foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de fluorescência. Os autores também compararam seu procedimento de extração por DLLME com QuEChERS. As proteínas foram precipitadas usando ácido tricloroacético (TCA) e depois filtradas. O procedimento de extração DLLME foi desenvolvido utilizando análise fatorial com planejamento tipo composto central. Os volumes ótimos para o solvente de extração (clorofórmio) e o solvente dispersivo (ACN) foram 1,0 mL e 1,9 mL, respectivamente. A DLLME resultou em LD inferiores (0,73-1,21 µg/L⁻¹) do que QuEChERS (1,15-2,73 µg/L⁻¹) e maiores recuperações (92,9% - 104,7% em comparação com 83,6% - 97,1%, quando as amostras foram adicionadas com sulfonamidas a 150 µg/L). A QuEChERS mostrou ser mais reprodutível do que a DLLME com menores percentuais de DPR de 2,9% -7,1% e 3,0% -9,7%, respectivamente.

Em um estudo realizado por Karami-Osboo e colaboradores (2014), o DLLME foi acoplado a QuEChERS para a determinação de seis antibióticos fluoroquinolonas com detecção de CLAE-UV. O sobrenadante seco do método QuEChERS foi ressuspenso em 1,0 mL de uma mistura de ácido acético e acetonitrila a 10%, combinada com 200,0 µL de clorofórmio e injetado rapidamente em 4,0 mL de água desionizada. A solução turva foi centrifugada durante 5,0 min a 4500 rpm. Ao acoplar QuEChERS à DLLME, os autores removeram a interferência da matriz, o que é um problema comum com a detecção de fluoroquinolonas. O método mostrou boa recuperação (74,1-101,4% para todos os analitos) e

LQ baixos (abaixo de 2,5 µg/kg para DAN e abaixo de 15 µg/kg para todos os outros analitos).

3.8 Cromatografia a gás

A cromatografia é um método físico-químico de separação, fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações, entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias proporciona uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação (HARRIS, 2012).

A cromatografia a gás faz parte de um importante grupo de métodos de separação, que nos permite separar, isolar identificar e quantificar substâncias, mesmo em misturas muito complexas, sendo por isso uma das técnicas mais empregadas. Nos dias de hoje, as colunas capilares são as mais utilizadas nestas determinações em temperaturas que excedem 350°C. Aplicações a essas altas temperaturas requerem fases estacionárias especiais e tubos que não se decompõem (HARRIS, 2012).

Na cromatografia a gás, os componentes de uma amostra vaporizada são separados em consequência de sua partição entre uma fase móvel gasosa e uma fase estacionária líquida ou sólida contida dentro da coluna. Ao realizar-se uma separação por cromatografia a gás, a amostra é vaporizada e injetada na coluna cromatográfica. A eluição é feita por um fluxo de fase móvel gasosa inerte. Em contraste, com muitos outros tipos de cromatografia, a fase móvel não interage com as moléculas do analito; sendo sua única função transportar o analito através da coluna. Dois tipos de cromatografia gasosa são encontrados: cromatografia gás líquido (CGL) e cromatografia gás-sólido (CGS) (HARRIS, 2012).

Existem diversos modos de injeção em colunas capilares, sendo o modo de injeção *splitless* (sem divisão de fluxo) o mais utilizado para quantidades-traço de solutos com alto ponto de ebulição solubilizados em solventes com baixo ponto de ebulição, como é o caso dos pesticidas (HARRIS, 2012).

3.9 Análise de pesticidas por Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM)

Técnicas cromatográficas mais simples para determinação de pesticidas como a cromatografia em camada delgada já foram muito utilizadas, porém devido a sua baixa

sensibilidade passou a ser substituída por técnicas mais avançadas. A sua utilização é bem restrita, sendo mais utilizada para análises preliminares de identificação. Com o desenvolvimento de equipamentos de análises que proporcionaram investigações em menor tempo destes compostos, houve uma aplicação maior dos cromatógrafos a gás (CG) e líquido de alta eficiência (CLAE), dependendo do tipo de matriz e principalmente das características dos pesticidas (CUNHA, 2003).

Anteriormente a cromatografia a gás com sistemas clássicos de detecção, como Captura de Elétrons (ECD, *Electron Capture Detector*), Nitrogênio-Fósforo (NPD, *Nitrogen and Phosphorus Detector*) e Fotometria de Chama (FPD, *Flame Photometric Detector*) era muito utilizada para análise de resíduos de pesticidas (CHIARADIA, *et al.*, 2008). No entanto, também se têm utilizado a CG acoplada a espectrometria de massas (EM) (LEANDRO *et al.*, 2005), com a finalidade de monitorar a presença de pesticidas em frutas e vegetais, utilizando os modos de varredura completa (*Full Scan*) e monitoramento seletivo de íons (SIM, *Selected Ion Monitoring*).

A varredura de massa é o resultado da aplicação de um único campo dipolar suplementar nos eletrodos-tampa (direção axial-z) do “Ion Trap”, e de um aumento linear da voltagem de radiofrequência. À medida que a voltagem aumenta, as frequências circulares dos íons aumentam e as trajetórias iônicas se tornam instáveis sucessivamente na ordem crescente de suas razões massa/carga. Os principais modos de varredura utilizados são o SIM e a corrente de íons monitorados (MIC, *Monitoring Ion Current*). O método de MIC, não se trata de um isolamento dos íons durante a análise, mas sim de um procedimento off-line realizado com a ajuda de um software do sistema do EM para que se escolham quais íons do espectro total serão utilizados em uma reconstituição do cromatograma na qual analisamos apenas o que for importante para a pesquisa. Este método possibilita a seleção de um único íon, a soma de até três íons ou um intervalo iônico na reconstrução do cromatograma. Quando se utiliza o modo de Monitoramento do íon selecionado (SIM), os íons são previamente selecionados pelo operador conforme seu tempo de retenção, a fim de analisar apenas o que lhe interessa e tornar a precisão da espectrometria ainda maior (BUSTILLOS, 2003).

O equipamento de espectrômetro de massas trabalha com seleção de uma pequena faixa de massas ou valor unitário de massa, portanto quanto menor a faixa de massas, maior a especificidade da análise. O modo SIM é mais específico que o *Full Scan*, pois este último modo é uma varredura de uma ampla faixa de massas, realiza a identificação do composto de

interesse dificultada pela coeluição de compostos de mesma massa, o pós-processamento do cromatograma com extração de massa de interesse, no entanto, devido ao processo de varredura possui sensibilidade inferior que o SIM (BUSTILLOS, 2003).

A facilidade do acoplamento das colunas cromatográficas com estes detectores de massas, além da disponibilidade de um banco de espectros padrões (bibliotecas) obtidos no modo de impacto de elétrons (EI, *Electron impact Ionization*), ajudaram na disseminação da técnica para a análise de resíduos de pesticidas, sendo uma das principais ferramentas para esse tipo de análise (LEANDRO *et al.*, 2005).

A ionização dos pesticidas em CG-EM pode ser realizada utilizando os modos EI ou ionização química (CI) positiva ou negativa. Como vantagens da utilização do modo EI tem-se a baixa influência da estrutura molecular na resposta e o grande número de fragmentos característicos que são gerados. Por outro lado, o modo CI positivo ou negativo proporciona melhor seletividade para muitos pesticidas quando comparado com o modo EI (CHIARADIA *et al.*, 2008).

Essa técnica permite que a determinação e a confirmação de um grande número de compostos sejam feitas simultaneamente, em um único instrumento e em uma única corrida cromatográfica. Os baixos valores de LD obtidos são consequência da alta seletividade promovida pelo uso de diferentes modos, como por exemplo, o modo SIM (CHIARADIA *et al.*, 2008).

A seletividade dos resultados obtidos com a técnica de CG-EM é maior do que aquela obtida com o uso de detectores clássicos, porém, interferências provenientes da matriz podem influenciar o resultado e a identificação dos analitos pode ser comprometida. Recentes avanços em espectrometria de massas propõem um aumento da especificidade, a partir da exclusão do íon dos interferentes da matriz (BÉGUIN *et al.*, 2006).

3.10 Validação do método cromatográfico

A necessidade de demonstrar a eficiência e a qualidade da execução de métodos analíticos, por meio de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a prejuízos financeiros irreparáveis e por consequência uma perda da credibilidade do laboratório, portanto, para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e

interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação (RIBANI *et al.*, 2007).

Validação é o ato ou efeito de validar, dar validade, tornar válido, legítimo ou legal, visando diminuir ou controlar os fatores que levam à imprecisão ou inexatidão de um dado gerado. Os instrumentos e métodos analíticos devem ser validados antes do uso de rotina, após manutenção e em intervalos de tempos regulares (LANÇAS, 2004).

Ribani *et al.*, (2004) apresentaram, de maneira clara e objetiva, a validação de métodos como sendo um processo contínuo de avaliação dos métodos, desde a etapa de planejamento, passando pelo desenvolvimento e coleta de dados, até o monitoramento constante da aplicação e transferência deste. O objetivo é garantir que os dados possuam a qualidade necessária, no que se refere a confiabilidade e rastreabilidade, entre outros, para o fim que se propõe.

É de fundamental importância, que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos para demonstrar, por meio da validação, que os métodos de ensaio que executam conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida. Os parâmetros geralmente envolvidos no procedimento de validação dos métodos analíticos são: seletividade e especificidade, linearidade, limite de detecção e quantificação, precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e exatidão (MAPA, 2015; SANTE, 2017).

Sendo assim, deve-se selecionar, estudar e monitorar constantemente os parâmetros mínimos necessários para garantir a interpretação inequívoca dos resultados, para isto, a validação do método analítico para a determinação de pesticidas deve ser realizada de acordo com o documento de orientação da Comissão Europeia nomeado “*Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed*” e de acordo com o “Manual de Garantia da Qualidade Analítica: áreas de identidade e qualidade de alimentos e de insumos” do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.

3.10.1 Especificidade – Efeito matriz

A seletividade e/ou especificidade é um parâmetro de validação indireta de um método e pode ser definido como a capacidade de um método analítico para determinar e discriminar inequivocamente o analito em estudo de outros compostos que possam estar presentes na

amostra, como impurezas, produtos de degradação, excipientes, metabólitos ou outros componentes da matriz. Para o desenvolvimento e validação de um método é fundamental a verificação da existência de compostos interferentes que possam comprometer a capacidade do método em identificar os analitos de interesse (CASSIANO, 2009). A avaliação da seletividade é determinada pela aplicação de um método, mas também, da técnica instrumental a ser utilizada. Com a utilização da técnica de CG-EM obtêm-se maior seletividade, pois é possível a partir da exclusão de íons indesejáveis remover os interferentes oriundos das matrizes que podem influenciar na quantificação e identificação dos analitos alvos (BÉGUIN, *et al.*, 2006).

Nos métodos cromatográficos em particular, a seletividade também pode ser avaliada por meio da identificação dos compostos, pois tendo em conta os tempos de retenção (t_r), é possível avaliar a resolução de dois picos cromatográficos com tempos de retenção muito próximos. Este é um dos primeiros passos no desenvolvimento e validação de um método, uma vez que se a especificidade/seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão poderão estar seriamente comprometidas (CASSIANO, 2009).

A determinação do efeito matriz pode ser feita com base na comparação das inclinações das curvas analíticas dos compostos em solvente e na matriz utilizando as mesmas concentrações (FERRER *et al.*, 2011). Para estimar esse efeito, realiza-se a comparação entre os coeficientes angulares das equações de reta obtidas utilizando a equação abaixo:

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

Onde:

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

X_2 = média das inclinações da curva preparada em solvente.

Por meio desta equação, 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.

3.10.2 Curva analítica e linearidade

A linearidade de um método analítico pode ser definida como a habilidade deste método em gerar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, em uma determinada faixa de concentração (INMETRO, 2011).

Para a maioria das técnicas cromatográficas, observa-se uma relação linear de primeira ordem entre a resposta instrumental medida (eixo y) (variável dependente) e a concentração do analito (eixo x) (variável independente). Essa relação produz uma equação de regressão linear $y = ax + b$, que relaciona as duas variáveis x e y e gera os coeficientes de regressão a (inclinação da curva) e b (interseção da curva analítica com o eixo y, quando $x = 0$). Essa equação é válida para um intervalo determinado de concentração do analito, independente da técnica instrumental utilizada. Também é possível calcular o coeficiente de correlação (r), que pode ser utilizado para estimar a qualidade da curva analítica uma vez que demonstra uma menor variação dos dados obtidos quanto mais próximo de 1 for o valor de r (RIBANI *et al.*, 2004). Valores de r iguais ou superiores a 0,99 e 0,90, são recomendados, respectivamente, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2017) e pelo Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO, 2011).

A faixa linear de um método de ensaio é o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito no qual foi demonstrado ser possível a determinação com a precisão, exatidão e linearidade exigidas, sob as condições específicas do ensaio. A faixa linear é definida como sendo a faixa de concentração na qual a sensibilidade pode ser considerada constante e é normalmente expressa nas mesmas unidades do resultado obtido pelo método analítico (INMETRO, 2011).

3.10.3 Precisão

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. É expressa por meio da estimativa do desvio padrão relativo (DPR) e pode ser determinada em termos de repetibilidade e precisão intermediária (RIBANI *et al.*, 2004).

A repetibilidade expressa a precisão nas mesmas condições de operação (equipamento, analista, reagentes, dia e mesmas condições ambientais) em um pequeno espaço de tempo. O parâmetro pode ser avaliado com, no mínimo, nove determinações dentro do intervalo de três diferentes concentrações e três replicatas cada, ou com, no mínimo, seis determinações para uma única concentração-teste. A precisão intermediária expressa as variações no mesmo laboratório, mas envolvem diferentes dias, analistas e equipamentos, entre outros. O método será considerado preciso quando apresentar níveis de variações dentro do aceitável para cada nível de concentração (AMARANTE, *et al.*, 2001).

Para métodos empregados em determinações ao nível de traços, valores de DPR% inferiores a 20% são aceitáveis (SANTE, 2017).

3.10.4 Exatidão

É uma medida da concordância existente entre os dados obtidos em uma determinada medida e um valor de referência assumido como sendo o verdadeiro (RIBANI *et al.*, 2004). Na indisponibilidade de material de referência certificado, a exatidão pode ser avaliada por meio de ensaios de fortificação e recuperação (CODEX ALIMENTARIUS, 2001) e geralmente expressa em percentual - (%). A equação abaixo é utilizada para a determinação do percentual recuperado.

$$R\% = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100$$

Onde:

C_1 = Concentração determinada na amostra fortificada;

C_2 = Concentração determinada na amostra não fortificada;

C_3 = Concentração usada para fortificação.

Em geral, são aceitos intervalos de recuperação entre 70 e 120%, com precisão de até 20% para a maioria dos métodos analíticos (GARP, 1999), incluindo para análise de resíduos de pesticidas (HUBER, 1998). Excepcionalmente, quando a recuperação é baixa, porém consistente (i.e., demonstra boa precisão) e a razão para isso é bem estabelecida (e.g. devido à

distribuição de pesticida no processo de partição), uma recuperação abaixo de 70% pode ser aceitável (MAPA, 2015; SANTE, 2017).

3.10.5 Limite de detecção (LD)

A menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob condições experimentais estabelecidas constitui o limite de detecção. O limite de detecção pode ser determinado mediante o sinal/ruído, o desvio-padrão da resposta e do coeficiente angular e por processos estatísticos (MAPA, 2015; SANTE, 2017).

O sinal/ruído pode ser aplicado somente para processos analíticos que exibem linha de base. A determinação da razão sinal/ruído é realizada por meio da comparação dos sinais medidos da amostra com baixas concentrações conhecidas do analito com as do branco, estabelecendo-se a concentração mínima na qual o analito pode ser detectado (MAPA, 2015; SANTE, 2017).

O LD e LQ dos pesticidas podem ser obtidos com base na abordagem sinal-ruído descrita por Ermer e Miller (2005). O ruído da linha de base é obtido após a injeção da solução em branco, observada em uma distância igual a 20 vezes a largura à meia-altura dos picos dos pesticidas. O valor de LD é determinado experimentalmente com seis repetições usando a relação sinal-ruído de 3:1 (MAPA, 2015).

3.10.6 Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação do procedimento analítico é definido como o nível mais baixo no qual foi demonstrado que os critérios de exatidão e precisão foram atendidos. O valor de LQ é determinado experimentalmente com seis repetições usando a relação sinal-ruído de 10:1 (MAPA, 2015).

4 METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÕES

A metodologia, resultados e discussões da dissertação estão apresentados logo abaixo na forma de artigo científico, o qual será submetido para o período “*Food Chemistry*”.

5 ARTIGO

Desenvolvimento e validação de método analítico multirresíduo para pesticidas em extrato de soja utilizando microextração líquido-líquido dispersiva e cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

Resumo

O objetivo do estudo foi desenvolver um método para determinação multirresíduo de uma mistura de pesticidas em extrato de soja, utilizando DLLME e CG-EM. Adicionou-se 5,0 mL de amostra de extrato de soja, NaCl e acetonitrila. Após agitação manual, a mistura foi centrifugada. Após a extração de pesticidas do extrato de soja, uma porção de fase sobrenadante (acetonitrila) foi removida, misturada com tetracloreto de carbono e injetada rapidamente por seringa em 5,0 mL de água ultrapurificada. Após a centrifugação, as gotículas finas de tetracloreto de carbono foram sedimentadas no fundo do tubo de ensaio cônico. CG-EM foram utilizados para a separação e determinação de analitos na fase sedimentada. Os resultados de validação foram satisfatórios, a curva de calibração foi linear na faixa de 0,500 – 5,0 µg/mL. O método apresentou limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) de 0,170 µg/mL e 0,50 µg/mL, respectivamente, apresentou recuperações entre 47 e 115%, com DPR inferior a 20% para níveis de fortificação entre 1,0 a 3,0 µg/mL. O método utilizado pode ser aplicado para análise de rotina em bebidas à base de soja, pois é rápido, de fácil execução e apresentou resultados de validação satisfatórios.

Palavras-chave: Extrato de soja, Cromatografia gasosa, Pesticidas, DLLME.

Abstract

The objective of the study was to develop a method for multiresidue determination of a mixture of pesticides in soybean extract using DLLME and CG-MS. 5.0 mL of soybean extract sample, NaCl and acetonitrile was added. After manual stirring, the mixture was centrifuged. After the extraction of pesticides from the soybean extract, a portion of supernatant phase (acetonitrile) was removed, mixed with carbon tetrachloride and rapidly injected via syringe into 5.0 mL of ultrapurified water. After centrifugation, the fine carbon tetrachloride droplets were settled on the bottom of the conical test tube. CG-MS were used for the separation and determination of analytes in the sedimented phase. The validation results were satisfactory, the calibration curve was linear in the range of 0.500 - 5.0 $\mu\text{g/mL}$. The method presented a limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) of 0.170 $\mu\text{g/mL}$ and 0.50 $\mu\text{g/mL}$, respectively, recovering between 47 and 115%, with a RSD of less than 20% for fortification levels between 1.0 to 3.0 $\mu\text{g/ml}$. The method used can be applied for routine analysis in soy based drinks, since it is fast, easy to perform and has satisfactory validation results.

Keywords: soybean extract, gas chromatography, pesticides, DLLME.

1 Introdução

O extrato de soja (ES) por ser um alimento rico em proteínas e por não conter colesterol ou lactose vem sendo recomendado como alternativa saudável ao leite bovino (Içier *et al.*, 2015). O produto possui também isoflavonas, flavonóides classificados como fitoestrógenos devido às suas atividades semelhantes ao estrogênio. A literatura relata uma série de atividades funcionais benéficas das isoflavonas, incluindo atividade anticancerígena, prevenção de doenças cardiovasculares, melhoria da saúde óssea e atividades antioxidativas (Ososki & Kennelly, 2003; Chung *et al.*, 2000; Ikeda *et al.*, 2006).

As bebidas à base de soja representam uma alternativa de alimentação com diversos benefícios à saúde humana, no entanto, apesar dos benefícios do consumo de tais bebidas, elas podem conter resíduos de pesticidas aplicados na soja para controle de pragas e doenças. Níveis elevados de pesticidas nos alimentos podem resultar em diversos efeitos adversos para a saúde humana, tais como: câncer, doenças neurodegenerativas e distúrbios reprodutivos (Gold *et al.*, 2001; Yarita *et al.*, 2014; Nougadère *et al.*, 2014).

Devido à toxicidade dos pesticidas e para garantir práticas agrícolas adequadas, vários países estabeleceram níveis máximos de resíduos (LMR) nos alimentos para uma grande quantidade de pesticidas. A produção de soja requer grandes quantidades de pesticidas e não há na Europa e Brasil legislação atual que estabeleça LMR para resíduos de pesticidas em bebidas à base de soja, dificultando o controle do uso indiscriminado desses compostos e a preservação da saúde.

A preparação de amostras para a análise multirresíduo é normalmente necessária para isolar e concentrar compostos de interesse da matriz da amostra antes da análise cromatográfica (Matsadiq *et al.*, 2011). A determinação de resíduos de pesticidas em matrizes de alimentos é um desafio, especialmente devido à baixa concentração de analitos e composição de matrizes, as quais são complexas na maioria dos casos (Rizzetti *et al.*, 2016).

Nos últimos anos, os esforços foram direcionados para a miniaturização do procedimento de extração, reduzindo significativamente o volume de solvente de extração, levando ao desenvolvimento dos métodos de microextração por solvente (SME). As principais vantagens das SME em relação aos outros métodos comuns são a redução do consumo de solvente orgânico e o aumento da sensibilidade.

Um dos principais métodos de SME é a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME), a qual pode ser usada como alternativa às etapas de extração e limpeza em amostras complexas (Daneshfar *et al.*, 2009). A DLLME foi introduzida por Assadi e colaboradores em 2006 para a determinação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (Rezaee *et al.*, 2006). A técnica baseia-se no sistema de solventes dos componentes ternais, incluindo solvente de extração, solvente dispersivo e amostra aquosa contendo o analito de interesse. Possui vantagens de alto fator de enriquecimento (FE), alta recuperação, baixo custo, simplicidade, rapidez e operação fácil (Rezaee *et al.*, 2010). Além disso, a DLLME tornou-se uma técnica de preparação de amostras ambientalmente correta, porque consome baixo volume de solvente orgânico. A DLLME foi aplicada para a análise de pesticidas em alimentos tais como melancia e pepino (Zhao, *et al.*, 2007), vinho (Cabo *et al.*, 2011), suco de maçã (Cunha *et al.*, 2009) e leite de vaca (Farajzedh, *et al.*, 2011), no entanto, a literatura pesquisada não relata métodos para determinação de pesticidas utilizando DLLME e CG-EM em extratos de soja.

Diante disso e considerando a importância para a saúde humana, para a economia e para o controle de qualidade, este estudo pretende desenvolver e validar um método rápido, simples e eficaz baseado na utilização da técnica de microextração líquido-líquido dispersiva e a determinação por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) de 26 pesticidas em extrato de soja.

2 Material e métodos

2.1 Reagentes

Pesticidas (Figura 1) obtidos da Sigma-Aldrich (São Paulo-SP, Brasil). Clorofórmio, tetracloreto de carbono, hexano, acetonitrila, metanol, ácido fosfórico, cloreto de sódio e acetona obtidos da Merck® (Darmstadt, Alemanha). A água purificada foi preparada usando Milli-Q Plus® (Millipore, Bedford, EUA). As amostras de extrato de soja embaladas em caixas de tetrapack foram adquiridas em supermercados locais (Uruguaiana-RS, Brasil).

2.2 Instrumentação

A análise cromatográfica foi realizada utilizando um cromatógrafo a gás QP2010 equipado com um espectrômetro de massa (Shimadzu[®], Tóquio, Japão). A separação foi realizada em uma coluna capilar (Restek[®], Bellefonte, PA, EUA) Rtx-5 (30 m x 0,25 mm d.i.; 0,25 μ m) em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM) para quantificação dos pesticidas. Centrífuga Heraeus Megafuge 16R (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA), pHmetro (Hanna Instruments, Woonsocket, Rhode Island, EUA) e pipeta automática (Digipet, Curitiba-PR, Brasil).

2.3 Condições cromatográficas

Os pesticidas extraídos do extrato de soja foram analisados utilizando o método de CG-EM equipado com uma fonte de ionização por impacto elétrico (IE). As amostras foram injetadas em modo *splitless* (sem divisão de fluxo), com injetor mantido a 250 °C. A programação da temperatura do forno foi 70°C por 1 minuto, em seguida foi utilizada uma rampa de 20°C por minuto até 200°C, e após outra de 4°C por minuto até 250°C. Utilizou-se como gás de arraste hélio a uma taxa de fluxo de 1,7 mL/min. Os dados de CG-EM foram adquiridos em 30 minutos com *delay* de solvente de 5 minutos e uma taxa de varredura normal na faixa de massa de 50-600 Da. A temperatura do detector foi mantida a 290°C.

2.4 Extração de pesticidas da amostra de extrato de soja

Em um tubo de fundo cônico de 15 mL foram adicionados 5,0 mL da amostra de extrato de soja (sem pesticidas) e 70 μ L da solução padrão contendo a mistura de pesticidas (1,50 μ g/mL). Adicionou-se 1,0 g de NaCl e 3,0 mL de acetonitrila, agitou-se manualmente por 20 s e a mistura foi centrifugada a 4000 rpm durante 5 min. Após a centrifugação e precipitação das proteínas, 1,5 mL da solução de acetonitrila extratora contendo os pesticidas (SAECP) foram coletados e utilizados no procedimento de DLLME, descrito abaixo.

2.5 DLLME

Uma alíquota de 70,0 μ L de tetracloreto de carbono foi adicionada a 1,5 mL da SAECP e injetado rapidamente em 5,0 mL água ultrapurificada pH 2 (ajustado com ácido

fosfórico 10%) contida em um tubo com fundo cônico. Uma solução turva, resultante da dispersão das gotículas finas de tetracloreto de carbono na solução aquosa foi formada no tubo. A mistura foi centrifugada a 4000 rpm durante 5 minutos. As gotículas de tetracloreto de carbono dispersas foram sedimentadas no fundo do tubo de ensaio cônico e logo após foram retiradas com uma ponteira de 100,0 µL. Esta alíquota foi transferida para um vial de 2,0 mL contendo um *insert* de 200,0 µL e 2,0 µL da mistura foi injetado no cromatógrafo a gás no modo *splitless*.

2.6 Validação do método analítico

O método proposto foi validado avaliando-se a seletividade, LD e LQ, efeito da matriz, linearidade, exatidão e precisão de acordo com as normas internacionais para a análise de pesticidas para análise cromatográfica (SANTE/11813/2017; MAPA, 2015).

A seletividade foi avaliada por meio da verificação da interferência dos constituintes da amostra na determinação dos pesticidas. Foram injetados os extratos de amostras não fortificadas e amostras fortificadas na concentração de 0,50 µg/mL. Posteriormente comparou-se os cromatogramas a fim de verificar se algum interferente ou constituinte da amostra poderia estar coelúndo com os analitos selecionados e se isso afetaria a análise por CG-EM. Os valores de LD e LQ foram determinados como as concentrações do composto que deram uma relação sinal-ruído (S/N) de 3 e 10 vezes, respectivamente. O efeito da matriz foi estudado por meio da análise dos padrões adicionados na matriz de amostras e os padrões em solventes.

As proporções das respostas de pesticidas adicionados em uma matriz de amostra às suas respostas em solvente puro foram calculadas e expressas como um efeito de matriz. A linearidade do método analítico para a quantificação dos pesticidas foi determinada com as seguintes concentrações da solução padrão: 0,50; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0 e 5,0 µg/mL. A exatidão do método foi realizada por meio da análise da recuperação dos pesticidas no extrato de soja nas concentrações de 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 µg/mL. A precisão intradia e interdia do método foi realizada por meio da determinação do DPR em 7 amostras na concentração 2,0 µg/mL de pesticidas adicionados ao extrato de soja.

3 Resultados e discussão

3.1 Desenvolvimento do método analítico

Durante o desenvolvimento do método analítico foi utilizada uma solução padrão contendo a mistura dos pesticidas em acetonitrila a 1,0 µg/mL. Na análise utilizando CG-EM foram realizados diferentes modos de varredura da espectrometria de massas, a varredura “*Scan*”, a Corrente de Íons Monitorados (MIC) e o monitoramento seletivo de íons (SIM). No modo *Scan* foi possível analisar todos os íons presentes na solução padrão dos pesticidas. O MIC é uma ferramenta do software que possibilitou selecionar apenas os picos de interesse da análise feita com o *Scan* e fazer um novo cromatograma apenas com os íons de interesse. O modo SIM permitiu detectar apenas os íons selecionados pelo operador.

Estudos iniciais foram realizados utilizando condições cromatográficas para o método por CG-EM descritos na literatura (Otake *et al.*, 2009; Pengyan *et al.*, 2006). Nestas condições foram utilizados uma coluna de fase apolar Restek (Rtx-5, 30 m x 0,25 mm d.i.; 0,25 µm) e programação de temperatura lenta, totalizando 62 minutos de análise. Inicialmente, utilizou-se a mesma coluna, razão de divisão de fluxo de 1,7 e injeção de 1,0 µL da solução padrão no modo *splitless*. A programação do forno foi: 50°C por 5 minutos, seguido de rampa de 10°C min⁻¹ até 300°C, mantido por 32 minutos, totalizando 45 minutos de análise. A partir destas condições, novas alterações foram realizadas utilizando a mesma coluna capilar e mesma razão de divisão, no entanto modificou-se o volume de injeção do padrão para 2,0 µL no modo *splitless*. A programação do forno foi: 70°C por 1 minuto, em seguida uma rampa de 20°C/min até 200°C, e após outra de 4°C/min até 250°C totalizando 30 minutos de análise. A figura abaixo apresenta o cromatograma nestas condições de análise (Figura 1).

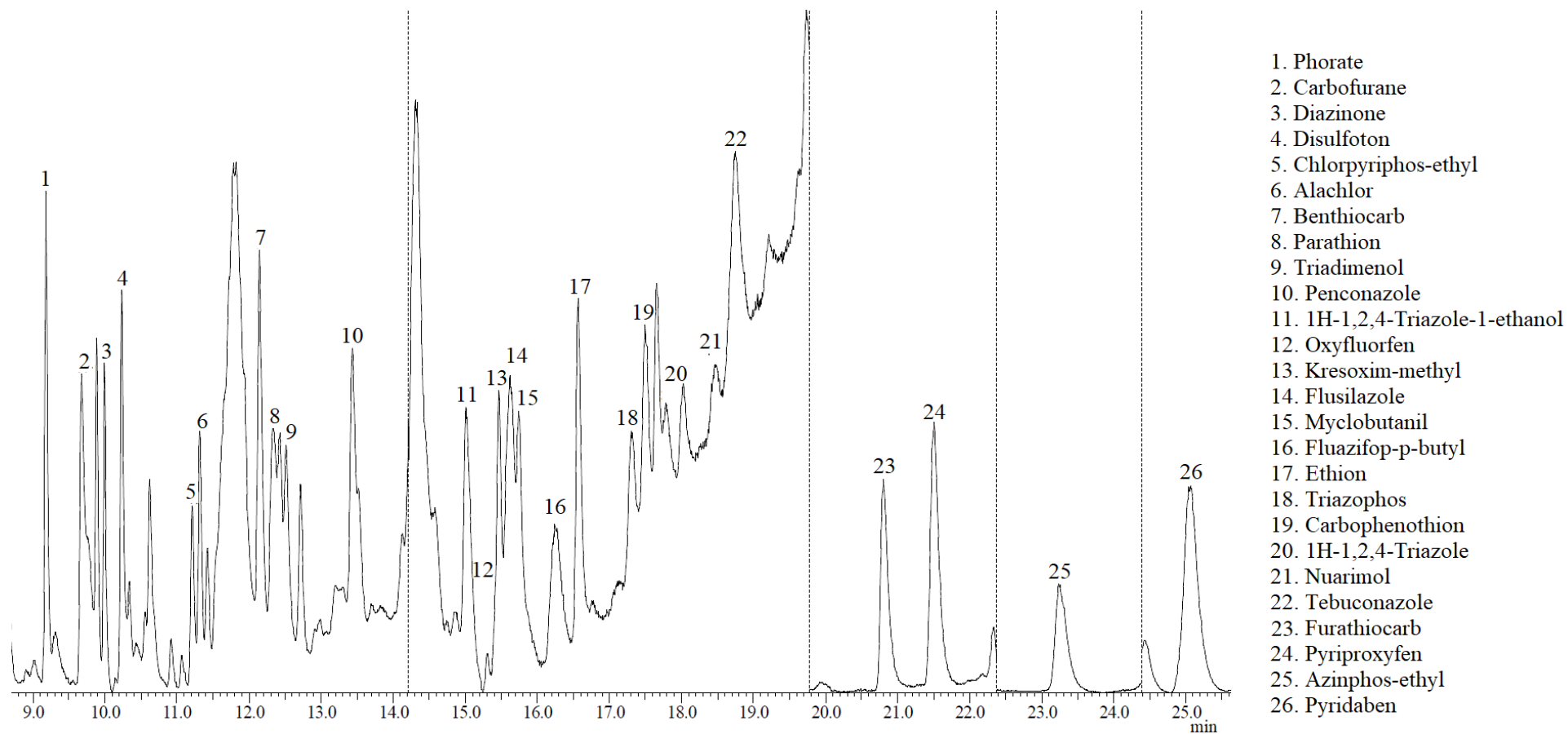


Figure 1. Cromatograma em modo TIC do padrão dos pesticidas. Condições cromatográficas: modo *splitless* com a porta de injeção mantida a 250 °C; programação da temperatura do forno: 70°C por 1 minuto, rampa de 20°C por minuto até 200°C e 4°C por minuto.

3.2 Otimização de parâmetros na extração de pesticidas da amostra de extrato de soja

O mesmo solvente de extração dos pesticidas da amostra de extrato de soja foi usado como solvente dispersor durante os estudos de DLLME. Os requisitos para a seleção deste solvente são a capacidade para a extração de analitos a partir da amostra, juntamente com a precipitação de proteínas e a sua miscibilidade com a fase aquosa. Para isto, acetonitrila, acetona e metanol foram testados como solventes de extração. Os resultados mostraram que apenas a acetonitrila formou um sistema de duas fases quando foi adicionado à amostra de extrato de soja, sendo escolhida como solvente de extração nos experimentos posteriores.

O efeito do volume de acetonitrila foi estudado no intervalo de 1,0; 1,5 e 3,0 mL. No volume de 1,0 mL de acetonitrila não foi possível coletar nenhuma fase orgânica pois esta não foi formada na fase superior da fase aquosa. A partir dos dados obtidos, foi escolhido 3,0 mL como o volume do solvente de extração devido a obtenção de um maior volume de solvente coletado após o processo de centrifugação para ser utilizado no passo DLLME.

O efeito da força iônica foi avaliado pela adição de NaCl na faixa de 0,5; 1,0 e 1,5 g na amostra de extrato de soja (5,0 mL) contendo a solução padrão dos pesticidas. Neste estudo, a adição deste sal auxiliou a precipitação das proteínas e melhorou a formação do sistema de formação das duas fases. Os melhores resultados foram encontrados com a adição de 1,0 g de cloreto de sódio pois observou-se ótima separação das fases, diferente do que ocorreu quando foi utilizado 0,5 e 1,5 g de NaCl.

Outros parâmetros que podem afetar a extração de pesticidas da amostra do ES são o tempo de centrifugação e a velocidade de centrifugação. O processo de centrifugação foi estudado nos seguintes tempos: 3, 5 e 10 min e a velocidade de rotação em 2000, 4000 e 5000 rpm. Os melhores resultados obtidos foram 5 min e 4000 rpm de tempo de centrifugação e velocidade de centrifugação, respectivamente.

3.3 Otimização de parâmetros na DLLME

3.3.1 Seleção do solvente e do volume de extração em DLLME

Tetracloroeto de carbono, clorofórmio e hexano em diferentes volumes (40,0; 70,0; e 100,0 μ L) foram testados como solventes no processo de extração do método de DLLME. A partir dos resultados obtidos, foi verificada a extração de 10, 20 e 26 pesticidas recuperados utilizando hexano, clorofórmio e tetracloroeto de carbono, respectivamente.

Para avaliar o efeito do volume do solvente de extração a ser utilizado, o procedimento por DLLME foi realizado utilizando 1,5 mL de acetonitrila contendo a mistura padrão dos pesticidas com diferentes volumes de tetracloreto de carbono: 40,0; 70,0 e 100,0 μL . Os resultados demonstraram que o volume de fase sedimentada aumentou quando foi utilizado o volume maior de tetracloreto de carbono (100,0 μL). No entanto, com o aumento do volume de solvente extrator, verifica-se a diminuição dos sinais analíticos. Diante disso, optou-se por utilizar 70,0 μL de tetracloreto de carbono no processo de extração por DLLME.

3.3.3 Efeito da adição de sais e do ajuste do pH

O efeito da força iônica da fase aquosa sobre a eficiência de extração foi avaliado pela adição de NaCl na fase aquosa na faixa de 0,5-1,5 g, enquanto que as demais condições experimentais foram mantidas iguais. O volume de fase sedimentada foi aumentado devido à diminuição da solubilidade do solvente de extração em fase aquosa na presença de sal. Os resultados mostraram que a adição de sal não teve efeito significativo nos sinais analíticos pois estes diminuíram na presença de sal, devido ao aumento do volume de fase sedimentada. Os experimentos posteriores foram realizados na ausência de sal na fase DLLME.

Outro parâmetro que deve ser levado em consideração é o pH. Para este fim, a DLLME foi realizada usando diferentes pH (2,0; 7,0 e 10) em água. Ao utilizar o pH neutro e alcalino, os pesticidas não foram extraídos. Portanto, o pH utilizado para a fase aquosa foi 2.

3.3.5 Otimização da velocidade e tempo de centrifugação

O efeito do tempo e da velocidade da centrifugação foi avaliado nas faixas de 3, 5 e 10 min e 2000, 4000 e 5000 rpm, respectivamente. Os resultados demonstraram que quando foi utilizado 3 minutos não houve uma boa separação das fases e quando se utilizou 10 minutos a separação foi semelhante aos 5 minutos. Diante disso, realizou-se o processo utilizando 5 min. de agitação e 4000 rpm como velocidade, pois observou-se claramente a separação das fases e foi possível otimizar o tempo de centrifugação.

4 Validação do método

As condições ideais para todo o processo foram as seguintes: 5,0 mL de volume da amostra de ES; 1,0 g de NaCl como agente precipitante 3,0 mL de acetonitrila como solvente de extração e 1,5 mL como solvente dispersor; 70,0 µL de tetracloreto de carbono como solvente extrator, 5,0 mL de água na fase aquosa pH 2,0 e 5 minutos de centrifugação a 4000 rpm à temperatura ambiente (24° C).

Os valores de LD e LQ foram de 0,17 µg/mL e 0,5 µg/mL para a maioria dos compostos analisados, respectivamente. O intervalo de calibração (modelo linear) na faixa de 0,5 a 5,0 µg/mL para os pesticidas preparados em acetonitrila foi bastante eficiente, apresentando valores de coeficiente de correlação (r) superior a 0,99 para maioria dos analitos (Tabela 1).

Não foi necessário o uso de padrão interno para verificar a estabilidade do instrumento, pois o instrumento demonstrou reprodutibilidade do sinal cromatográfico em todas as injeções e provou ser eficaz para esse fim.

As bebidas à base de soja possuem uma grande quantidade de compostos que podem interferir no sinal do analito, fornecendo efeito de matriz (EM). Este efeito pode suprimir ou aumentar a ionização de analitos na fonte do espectrômetro de massa e conseqüentemente afetar os resultados de precisão e exatidão (Pinho *et al.*, 2009). Neste estudo, para a maioria dos compostos, o efeito da matriz não foi considerado significativo porque os valores estavam na faixa de menor que 20% (Ferrer *et al.*, 2011). Os resultados obtidos do efeito da matriz são apresentados na Tabela 1.

A exatidão e precisão de maioria dos analitos nos quatro níveis de fortificação foram considerados satisfatórios com recuperações de 47,0 a 125,0% e DPR ≤ 20,0%. Em geral, são aceitos intervalos de recuperação entre 70,0 e 120,0%, com precisão de até 20,0% para a maioria dos métodos analíticos (Garp, 1999; Huber, 1998). Excepcionalmente, quando a recuperação é baixa, porém consistente (i.e., demonstra boa precisão) e a razão é bem estabelecida (e.g. devido à distribuição de pesticida no processo de partição), uma recuperação abaixo de 70,0% pode ser aceitável (BRASIL, MAPA, 2015). Na avaliação da precisão intermediária utilizando a concentração de fortificação de 2,0 µg/mL (n = 7), os valores de recuperação variaram entre 58-130% com DPR ≤ 20%.

5 Conclusão

O método de extração por DLLME utilizando acetonitrila como solvente dispersor e tetracloreto de carbono como solvente extrator demonstrou-se adequado para extrair os pesticidas como boa recuperação a partir da matriz do extrato de soja. Além disso, apresenta uma série de vantagens em relação a outros métodos de extração, tais como tempo de extração, baixo consumo de solvente orgânico, simplicidade, baixo custo dos reagentes e eficiência de extração.

O método desenvolvido e validado por CG-EM mostrou-se também adequado para quantificação dos pesticidas no extrato de soja, demonstrando-se seletivo, linear, sensível, preciso, exato e robusto.

Table 1. Classification of pesticides studied, m / z, retention time (tr), r, recoveries and DPR of levels of fortification, precision and matrix effect.

Pesticida	m/z	tr	Íons	Linearity, r 0,50 – 5,0 µg/mL	Levels of fortification (µg/mL), n= 7				Intermediate accuracy, n=7	Matrix effect
					1,0 Rec±RSD(%)	1,5 Rec±RSD(%)	2,0 Rec±RSD(%)	3,0 Rec±RSD(%)		
Phorate	75	9.23	121-97	0,9592	73,41 ± 18,02	92,19 ± 8,15	161,59 ± 13,02	103,85 ± 12,43	105,08 ± 1,27	-11,42
Carbofurane	164	9.69	149-87	0,9907	59,42 ± 20,4	79,56 ± 19,86	131,19 ± 9,73	108,03 ± 11,61	101,59 ± 8,00	-71,46
Diazinone	137	10.07	179-152	0,9900	114,54 ± 15,89	79,10 ± 10,61	139,95 ± 14,28	107,93 ± 11,44	130,82 ± 9,87	10,83
Disulfoton	88	10.30	89-60	0,9939	105,57 ± 17,53	77,10 ± 12,93	124,78 ± 8,34	112,00 ± 11,19	123,71 ± 7,59	37,51
Chlorpyrifos-ethyl	286	11.27	125-288	0,9927	89,68 ± 18,13	54,80 ± 11,87	103,23 ± 19,04	84,19 ± 10,92	101,88 ± 1,87	-29,33
Alachlor	45	11.39	160-188	0,9918	101,68 ± 14,83	94,25 ± 9,70	142,31 ± 7,03	105,03 ± 10,60	133,33 ± 9,52	29,46
Benthiocarb	100	12.21	72-125	0,9900	127,71 ± 11,26	63,02 ± 12,73	89,62 ± 13,38	111,53 ± 9,48	85,46 ± 5,86	1,93
Parathion	97	12.50	109-291	0,9903	-	54,95 ± 10,85	115,51 ± 18,41	83,04 ± 17,62	104,42 ± 15,02	-12,87
Triadimenol	57	12.59	208-85	0,9747	86,85 ± 17,12	76,18 ± 15,75	61,46 ± 21,41	55,67 ± 18,43	58,56 ± 3,47	-45,58
Penconazole	159	13.49	248-161	0,9943	79,24 ± 8,31	65,68 ± 11,17	102,94 ± 9,95	70,83 ± 8,52	96,88 ± 1,71	-34,26
1H-1,2,4-triazole-1-ethanol	83	15.07	82-214	0,9916	122,43 ± 19,51	71,91 ± 18,16	87,21 ± 16,81	50,61 ± 15,49	88,22 ± 1,62	-49,83
Oxyfluorfen	252	15.53	300-361	0,9955	79,64 ± 10,45	88,74 ± 10,19	107,11 ± 9,51	97,66 ± 9,65	105,78 ± 1,78	-3,76
Kresoxim-methyl	116	15.61	131-59	0,9915	93,50 ± 11,67	93,74 ± 6,53	97,46 ± 11,02	-	94,79 ± 3,99	7,18
Flusilazole	233	15.67	206-234	0,9943	80,49 ± 6,58	69,09 ± 8,75	90,59 ± 11,02	57,76 ± 5,85	81,85 ± 1,99	-61,61
Myclobutanil	179	15.69	150-82	0,9917	64,79 ± 4,95	69,56 ± 1,25	100,51 ± 13,74	83,04 ± 17,62	101,06 ± 0,76	-78,79
Fluazifop-p-butyl	282	15.91	254-383	0,9950	89,38 ± 9,85	80,30 ± 13,83	117,36 ± 8,48	100,39 ± 12,44	119,11 ± 2,07	18,32
Ethion	231	16.72	97-153	0,9930	76,65 ± 8,08	67,41 ± 8,82	89,99 ± 13,72	82,15 ± 6,48	87,99 ± 3,23	-17,36
Triazophos	161	17.39	162-172	0,9900	109,16 ± 11,11	79,76 ± 5,32	90,46 ± 9,27	77,73 ± 13,11	86,35 ± 6,74	-30,03
Carbophenothion	157	17.63	97-121	0,9927	58,28 ± 11,90	65,64 ± 19,80	83,09 ± 12,45	84,26 ± 7,42	84,43 ± 2,24	-11,15
1H-1,2,4-triazole	69	17.89	173 -259	0,9961	77,12 ± 19,49	83,39 ± 19,19	71,78 ± 16,17	113,06 ± 17,21	70,05 ± 3,48	24,10
Nuarimol	107	18.74	139-235	0,9952	47,41 ± 9,15	61,32 ± 12,08	72,65 ± 5,01	69,14 ± 16,44	75,75 ± 7,94	-42,01
Tebuconazole	125	18.79	70-250	0,9950	66,61 ± 7,35	77,03 ± 6,72	75,50 ± 6,49	54,26 ± 12,8	75,78 ± 2,90	-37,66
Furathiocarb	163	20.98	135-194	0,9910	84,04 ± 9,68	96,27 ± 16,16	100,40 ± 9,86	82,24 ± 2,35	97,99 ± 4,08	-47,96
Pyriproxyfen	136	21.67	96-78	0,9954	68,13 ± 5,36	79,18 ± 13,55	86,09 ± 7,60	88,32 ± 11,66	85,76 ± 1,42	-12,83
Azinphos-ethyl	132	23.38	160-77	0,9952	63,66 ± 11,54	55,35 ± 9,72	92,85 ± 19,52	62,92 ± 3,15	93,40 ± 0,84	-24,33
Pyridaben	147	25.29	183-148	0,9931	136,40 ± 10,00	101,22 ± 9,84	99,93 ± 12,26	79,23 ± 1,39	100,79 ± 1,21	-36,58

Referencias

Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (2015). Manual de garantia da qualidade analítica: áreas de identidade e qualidade de alimentos e de insumos / Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília : MAPA/ACS, 51 p.

Cabo, T. R.; Rodríguez, I.; Ramil, M.; Cela, R. (2011). Dispersive liquid-liquid microextraction using non-chlorinated, lighter than water solvents for gas chromatography-mass spectrometry determination of fungicides in wine. *Journal of Chromatography A*, 1218, 6603-6611.

Chung, I. M., Kim, K. H., Ahn, J. K., Chi, H. Y., & Lee, J. O. (2000). Screening for antioxidative activity in soybean local cultivars in Korea. *Korean Journal of Crop Science*, 45(5), 328–334.

Cunha, S. C., Fernandes, J. O., Oliveira, M. B. P. P. (2009). Fast analysis of multiple pesticide residues in apple juice using dispersive liquid-liquid microextraction and multidimensional gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216, 8835-8844.

Daneshfar, A., Khezeli, T., Lotfi, H. J. (2009). Determination of cholesterol in food samples using dispersive liquid-liquid microextraction followed by HPLC-UV. *J. Chromatogr. B*, 877, 456–460.

European Comission (2018). Directorate-General For Health And Food Safety. SANTE/11813/2017. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed.

Farajzadeh, M. A., Djavanshir, D., Mogaddam, M. R. A., Bamorowat, M. (2011). Extraction and preconcentration technique for triazole pesticides from cow milk using dispersive liquid–liquid microextraction followed by GC-FID and GC-MS determinations. *J. Sep. Sci.*, 34, 1309–1316.

Ferrer, C., Lozano, A., Agüera, A., Jiménez Girón, A., Fernández-Alba, A. R. (2011). Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables. *J Chromatogr A*, 1218, 7634–7639.

GARP – associação grupo de analistas de resíduos de pesticidas (1999). *Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos*.

Gold, L. S., Slone, T. H., Ames, B. N., Manley, N. B.(2001). Pesticide residues in food and cancer risk: a critical analysis. *Handb Pestic Toxicol*, 1, 799–843.

Huber, L. Validation of analytical methods: review and strategy.(1998). *LC/GC International*, 11, 96-105.

Içier, F., Gündüz, G. T., Yilmaz, B., Memeli, Z. (2015). Changes on some quality characteristics offermented soy milk beverage with added apple juice. *Food Sci Technol LEB*, 63, 57–64.

Ikeda, Y., Iki, M., Morita, A., Kajita, E., Kagamimori, S., Kagawa, Y., & Yonesshima, H. (2006). In take of fermented soybeans, natto, is associated with reduced bone loss in postmenopausal women: Japanese population-based osteoporosis (JPOS) study. *The Journal of Nutrition*, 136(5), 1323–1328.

Matsadiq, G., Hua, H. L., Renb, H. B., Zhoua, Y. W., Liua, L., Chenga, J.(2011). Quantification of multi-residue levels in peach juices, pulps and peels using dispersive liquid–

liquid microextraction based on floating organic droplet coupled with gas chromatography-electron capture detection. *J Chromatogr B*, 879, 2113–2118.

Nougadère, A., Merlo, M., Héraud, F., Réty, J., Truchot, E., Vial, G., Cravedi, J. P., Leblanc, J. C. (2014). 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*, 41, 32–48.

Ososki, A. L., & Kennelly, E. J. (2003). Phytoestrogens: a review of the present state of research. *Phytotherapy Research*, 17(8), 845–869.

Otake, T., Aoyagi, Y., Yarita, T. (2009). Multiresidue analysis and monitoring of pesticides in rice by pressurized liquid extraction. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 44(5), 423-427.

Pengyan, L., Quingxue, L., Yusong, M., Jinwei, L., Xuan, J., Chin, J. (2006). Analysis of pesticide multiresidues in rice by gas chromatography-mass spectrometry coupled with solid phase extraction. *Chromatogr A.*, 24, 228–238.

Pinho, G. P., Neves, A. A., Queiroz, M. E. L. R., Silvério, F. O. (2009). Matrix effect in pesticide quantification by gas chromatography. *Química Nova*, 32, 987–995.

Rezaee, M., Assadi, Y., Hosseini, M. R. M., Aghaee, E., Ahmadi, F., Berijani, S. (2006). Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *J. Chromatogr. A*, 1116, 1–9.

Rezaee, M.; Yamini, Y.; Faraji, M. (2010). Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. *Journal of Chromatography A*, 1217, 2342-2357.

Rizzetti, T. M., Kemmerich, M., Martins, M. L., Prestes, O. D., Adaime, M. B., Zanella, R. (2016). Optimization of a QuEChERS based method by means of central composite design for pesticide multiresidue determination in orange juice by UHPLC–MS/MS. *Food Chem* 196, 25–33.

Yarita, T., Iwata, H., Otake, T., Watai, M., Aoyagi, Y., Mitsuda, H., Kuroda, Y., Fujikawa, T., Numata, M., Ota, H. (2014). Development of soybean certified reference material for pesticide residue analysis. *Talanta* 119, 255–261.

Zhao, E., Zhao, W., Han, L., Jiang, S., Zhou, Z. (2007). Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the analysis of organophosphorus pesticides in watermelon and cucumber. *Journal of Chromatography A*, 1175, 137-140.

6 DISCUSSÃO GERAL

A análise de pesticidas em subprodutos da soja é de suma importância, no entanto, não há LMR estabelecidos para o ES. Tendo em vista o elevado consumo e possibilidade de contaminação dos mesmos faz-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos rápidos, seletivos e sensíveis. Entretanto, não existem relatos na literatura sobre métodos para determinar pesticidas em ES por DLLME e CG-EM.

Com a finalidade de se obter as condições ótimas do sistema de detecção, foram injetados 2,0 µL da mistura de pesticidas em uma concentração de 5 µg/mL no modo *full scan*, a fim de se obter os tempos de retenção dos mesmos e a identificação dos íons característicos para cada composto (três) e posterior obtenção das fragmentações características de cada analito. Os íons selecionados foram monitorados no modo SIM. Com estes parâmetros otimizados, foram realizadas as quantificação e confirmação dos analitos de interesse. A transição (íon precursor) de maior intensidade foi utilizada para a quantificação do analito e a segunda maior intensidade para a confirmação do mesmo. Para avaliar se o método estava otimizado para validação foram selecionadas as melhores condições baseadas na avaliação dos resultados obtidos em função dos percentuais de recuperação (70 a 120%) e DPR ($\leq 20\%$).

Neste estudo, inicialmente, a mistura de pesticidas selecionados foi extraída da amostra de ES usando um solvente orgânico que atua como extrator para analitos e também serviu como agente precipitante das proteínas no primeiro passo. Além disso este solvente serviu como dispersor no processo de extração por DLLME.

Para selecionar as condições ideais do processo de extração por DLLME foi necessário otimizar os diferentes parâmetros que afetam a extração dos pesticidas da amostra de ES, tais como: seleção de solvente de extração adequado para a extração de analitos do ES (também solvente dispersor para o seguinte passo DLLME), o volume de solvente de extração no primeiro passo, o tipo de solvente de extração no passo DLLME e a força iônica da fase aquosa em ambas as etapas.

O solvente de extração de pesticidas da amostra de ES foi também utilizado como solvente dispersor no processo de DLLME. Os requisitos para a seleção deste solvente são sua capacidade para a extração de analitos a partir da amostra, juntamente com a capacidade de precipitação de proteínas no nosso caso. Além disso, este solvente deve ser miscível na fase

aquosa e no solvente de extração utilizado no processo de DLLME. Para isto, acetonitrila, acetona e metanol foram testados como solventes de extração. Os resultados demonstraram que apenas a acetonitrila formou um sistema de duas fases quando foi adicionado à amostra de ES. Portanto, a acetonitrila foi escolhida como solvente de extração para os experimentos posteriores. Neste experimento preliminar foi utilizado 1,0 g de NaCl, o qual também auxiliou no processo de precipitação das proteínas.

A adição de cloreto de sódio diminui a solubilidade dos analitos na fase aquosa, aumentando a sua partição para a fase orgânica (para LLE) ou adsorvente (para SPME). Neste estudo, a adição deste sal aumentou a eficiência de extração dos pesticidas do ES para o solvente extrator e auxiliou a precipitação das proteínas do ES. Além disso, o cloreto de sódio é um agente capaz de melhorar a formação do sistema de duas fases. Nota-se que, devido à utilização da técnica DLLME para pré-concentração de analitos antes da sua determinação por CG, é necessário usar um solvente orgânico no primeiro passo que é solúvel em fase aquosa. Por isso, é previsível que, ao aumentar a quantidade de sal, o volume de fase orgânica recolhida na fase aquosa também aumente. O efeito da força iônica foi avaliado pela adição de NaCl na faixa de 0,5 a 1,5 g na amostra de 5 mL de ES com pesticidas a uma concentração de 5 µg/mL (mistura de pesticidas), onde 1 g demonstrou-se ideal para o volume de fase sedimentada, pois pode-se identificar melhor a separação das fases.

O efeito do volume de acetonitrila foi estudado no intervalo de 1,0 a 3,0 mL. No volume de 1,0 mL de acetonitrila nenhuma fase orgânica foi coletada na parte superior da fase aquosa, portanto foi descartado de imediato. O volume de 3,0 mL foi escolhido como volume do solvente de extração, pois nestas condições obteve-se um maior volume de solvente coletado após o processo de centrifugação para ser utilizado no passo DLLME.

Outros parâmetros que podem afetar a extração de pesticidas da amostra ES são o tempo de centrifugação e a velocidade de centrifugação. Foram estudados na faixa de 3, 5 e 10 min e 2000, 4000 e 5000 rpm, respectivamente. Os melhores resultados obtidos visualizados na separação das fases foram encontrados utilizando 4000 rpm e 5 minutos de centrifugação.

Durante o processo de escolha do solvente de extração por DLLME foram testados tetracloro de carbono, clorofórmio e hexano. Justifica-se esta escolha, pois os mesmos possuem maior densidade que água, alta capacidade de extração de analitos, baixa solubilidade em água e bom comportamento cromatográfico. Os experimentos iniciais foram

realizados utilizando 1,5 mL de acetonitrila com os pesticidas (SAECP) contendo diferentes volumes de tetracloreto de carbono (40,0; 70,0 e 100,0 μL) para realização do procedimento de DLLME. O volume selecionado de solvente extrator foi 70 μL de tetracloreto de carbono, o qual apresentou o maior número de pesticidas extraídos, com adequados valores de recuperação, durante o procedimento de DLLME (Figura 2).

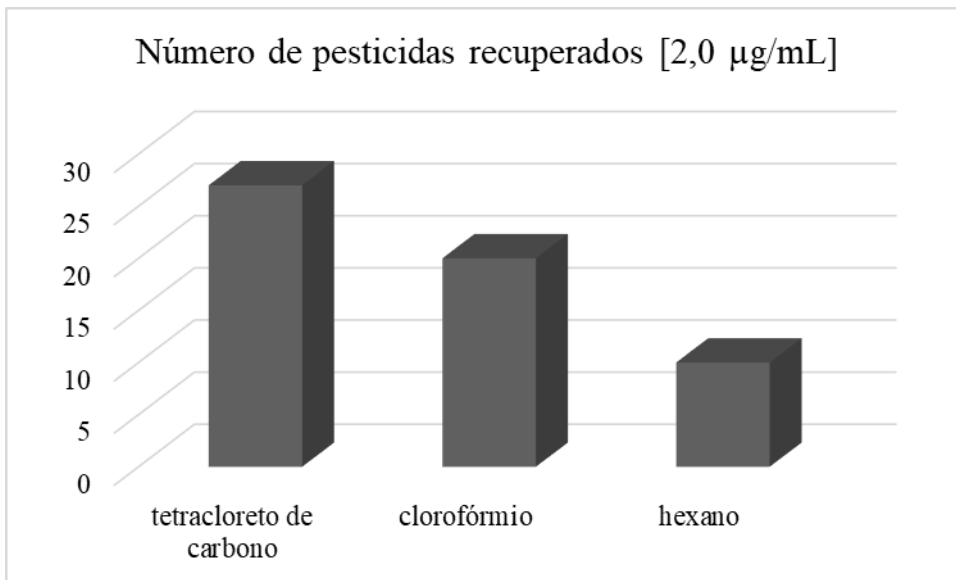


Figura 2. Seleção do solvente extrator para recuperação dos pesticidas a partir do procedimento de DLLME.

Percebe-se também que, no caso de 40,0 μL de tetracloreto, não houve formação de fase sedimentada, além disso, quando foram utilizados volumes menores de solvente extrator, o volume de fase sedimentada foi de 10,0 μL , sendo de difícil remoção podendo comprometer a repetibilidade do método.

A influência da força iônica também deve ser considerada durante o processo de DLLME, uma vez que influencia na separação das fases. O aumento na concentração de NaCl aumenta o volume de fase sedimentada, devido à diminuição da solubilidade do solvente extrator na presença de um sal. Esta influência será de acordo com as características de cada analito. Observa-se, uma grande variação da adição de NaCl, desde a não utilização até a adição de 0,5 a 30% (CALDAS, 2011).

O efeito do aumento da força iônica da fase aquosa sobre a eficiência do processo de extração por DLLME foi avaliado pela adição de cloreto de sódio na fase aquosa na faixa de 0,5 a 1,5 g. Os resultados demonstraram um aumento de volume da fase sedimentada devido à

diminuição da solubilidade do solvente de extração na fase aquosa na presença do sal cloreto de sódio. No entanto, a adição do cloreto de sódio não teve efeito significativo nos sinais analíticos pois estes diminuíram na presença de sal, devido ao aumento do volume de fase sedimentada. Os experimentos posteriores foram realizados na ausência de sal na fase DLLME.

Outro parâmetro que deve ser levado em consideração é o pH, o qual é otimizado em função da acidez ou basicidade de alguns compostos. O ajuste do pH do meio permite que os analitos permaneçam na forma neutra, facilitando a partição dos analitos nas microgotas do solvente extrator (CALDAS, 2011). Para este fim, a DLLME foi realizada usando diferentes valores de pH (2,0; 7,0 e 10,0) em água. Os melhores resultados foram obtidos utilizando o pH de 2,0 para a fase aquosa, pois nestas condições um maior número de analitos foi recuperado.

A centrifugação é um processo indispensável no DLLME. O efeito do tempo e da velocidade da centrifugação foi avaliado nas faixas de 3, 5 e 10 min e de 2000, 4000 e 5000 rpm, respectivamente. Os resultados demonstraram que esses parâmetros não tinham efeito sobre a eficiência de extração. Diante disso, 5,0 min e 4000 rpm foram selecionados como tempo de centrifugação e velocidade, respectivamente, neste estudo.

A validação do método foi realizada avaliando-se os seguintes parâmetros: seletividade, LD, LQ, influência da matriz, linearidade, exatidão e precisão.

O método foi considerado seletivo, uma vez que não foram detectados picos de interferência nos mesmos tempos de retenção dos analitos estudados utilizando o modo SIM. Assim a curva padrão foi realizada utilizando apenas a mistura padrão dos pesticidas em solvente. Os solventes e reagentes também foram avaliados para assegurar a ausência de contaminantes que possam interferir na análise, usando o procedimento de extração sem conter a amostra do ES. Nessa avaliação, também se observou também a ausência de interferentes. Além disso, o método SIM utilizado por espectrometria de massas permite distinguir cada um dos analitos de acordo com seus íons característicos, garantindo a seletividade do método analítico validado.

Os valores de LD e LQ do método analítico foram determinados a partir da relação sinal-ruído da linha de base. Os valores de LD e LQ foram de 0,170 e 0,50 µg/mL para a maioria dos compostos analisados, 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.

A complexidade das amostras e o número de compostos que co-eluem com elas acabam gerando um problema durante a análise, chamado efeito matriz. Este efeito pode ser notado pela significativa diferença de resposta obtida em padrões preparados no solvente daqueles preparados no extrato da matriz. Uma das maneiras de minimizar e/ou eliminar este efeito é reduzir a quantidade de componentes da matriz que co-eluem com os analitos no detector, para isto, métodos de extração mais seletivos e etapas mais extensivas de *clean-up* devem ser desenvolvidos. Contudo outras alternativas são usualmente utilizadas, como por exemplo, a calibração externa realizada em extrato da matriz idêntico ou similar ao da amostra (PICÓ *et al.*, 2004).

O efeito matriz foi estimado conforme a equação 1 (item 3.10.1) e para a maioria dos compostos, não foi considerado significativo, já que os valores foram inferiores a 20% (FERRER *et al.*, 2011). No entanto, para alguns compostos, como 1H-1,2,4-triazole, alachlor e dissulfoton, o efeito matriz apresentou maior intensidade, sendo de 24,10; 29,46 e 37,51% 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 (MAY, 2016).

A linearidade do método proposto na faixa de 0,50 a 5,00 µg/mL para a determinação dos pesticidas foi assegurada pela determinação do coeficiente angular (a), coeficiente linear (b) e coeficiente de correlação (r). Todos os analitos analisados apresentaram coeficiente de correlação superior a 0,90, sendo que a grande maioria apresentou valores superiores de r a 0,99.

A exatidão e precisão de maioria dos analitos nos três níveis de fortificação foram considerados satisfatórios com recuperações de 47 a 125% e DPR ≤ 20%. As recuperações aceitáveis da validação são aquelas dentro da faixa de 70-120%, com um DPR ≤ 20% para a maioria dos métodos analíticos, inclusive para análise de resíduos de pesticidas (GARP, 1999; HUBER, 1998). As taxas de recuperação fora do intervalo de 70-120% podem ser aceitas se forem consistentes (DPR ≤ 20%) e a base para isso está bem estabelecida, por exemplo, devido à distribuição do analito em um passo de particionamento, mas a recuperação média

não deve ser inferior a 30% ou acima de 140% (BRASIL, MAPA, 2015; SANTE/11813/2017).

Na avaliação da precisão intermediária utilizando a concentração de fortificação de 2,0 µg/mL (n = 7), os valores de recuperação variaram entre 58-110% com DPR < 20%.

O método desenvolvido foi aplicado na avaliação de amostras de extrato de soja. Foram encontrados resíduos dos analitos alvo nas amostras porém eles estavam muito abaixo (<0,1%) do LMR para os pesticidas selecionados.

A ausência de resíduos pode ser devido 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.

7 CONCLUSÃO

- O método de DLLME desenvolvido neste trabalho para extração dos pesticidas do extrato de soja demonstrou-se simples, rápido, reprodutível e de fácil aplicabilidade. Além disso, demonstra-se pouco custoso e ecologicamente correto, devido ao baixo consumo de solventes orgânicos;
- O método desenvolvido e validado por CG-EM para determinação dos pesticidas em extrato de soja possibilitou a determinação quantitativa dos resíduos de pesticidas, 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. Além disso, demonstrou-se seletivo, linear, exato e preciso;

8 PERSPECTIVAS

- Desenvolvimento e validação do método de análise para aqueles pesticidas que não foram determinados através das condições de análise empregadas nesse estudo;
- Aplicação do método validado para a identificação e quantificação dos resíduos dos pesticidas em outras matrizes de alimentos, bem como aumento do número de pesticidas a serem analisados;
- Otimização do método de extração para sua aplicação na análise de resíduos de pesticidas em outros alimentos.

9 REFERÊNCIAS

ALSHANA, U.; LUBBAD, I.; GOGER, N.; COK, I.; TAMER, U.; ERTAS, N. Dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic drop combined with counter-electroosmotic flow normal stacking mode in capillary electrophoresis for the determination of bisphenol a in water and urine samples. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 36, n. 20, p. 2855-70, 2013.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *J AOAC Int.*, v. 86, n. 2, p. 412-31, 2003.

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 (2017). Classificação e Rotulagem de agrotóxicos. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/registro>> . Acesso em 22 jun. 2017.

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 novembro de 2017.

ARROYO-MANZANARES, N.; G´AMIZ-GRACIA, L.; GARCÍA CAMPAÑA, A. M. Alternative sample treatments for the determination of sulfonamides in milk by HPLC with fluorescence detection. *Food Chemistry*, v.143, p.459–464, 2014.

BÉGUIN, S.; JADAS-HÉCART, A.; TABET, J. C. Protocols for optimizing MS/MS parameters with an ion-trap GC-MS instrument. *Journal of Mass Spectrometry*, v. 41, n. 10, p.1304-1314, 2006.

BIRJANDI, A. P.; BIDARI, A.; REZAEI, F.; HOSSEINI, M. R. M.; ASSADI, Y. Speciation of butyl and phenyltin compounds using dispersive liquid-liquid microextraction and gas chromatography-flame Photometric detection *J. Chromatogr., A*, v. 1193, p. 19-25, 2008.

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

BRASIL, Decreto nº 4.074 de 04 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei nº 7.802/89 (lei federal dos agrotóxicos). Brasília, Diário Oficial da União de 08/01/2002.

BRASIL, Lei nº 7.802, de 12 de julho de 1989. “Lei federal dos agrotóxicos”. Brasília, Diário Oficial da União de 12/07/1989.

BRASIL. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA. UFPR. Seminário de mercado de agrotóxico e regulação. ANVISA, Brasília, 11 abril de 2012.

BRASIL. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017 (Publicada no DOU nº141, de 25 de julho de 2017) Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências.

BRUZZONITI, M. C.; SARZANINI, C.; MENTASTI, E. Preconcentration of contaminants in water analysis. *Journal of Chromatography A*, v. 902, ed. 1, p. 289-309, 2000.

BUSTILLOS, O. V.; SASSINE, A.; MARCH. E. R. “A espectrometria de massas quadrupolar”. São Paulo : Scortecci, 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.

- CALDAS, S. S.; GONÇALVES, F.F.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L.; ZANELLA, R. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. *Química Nova*, v. 34, n. 9, p. 1604-1617, 2011.
- 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.
- CASSIANO, N. M. et al. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. *Química Nova*, v. 32, n. 4, p. 1021-1030, 2009.
- 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, n. 3, p. 623-636, 2008.
- CHUNG, I. M., KIM, K. H., AHN, J. K., CHI, H. Y., & LEE, J. O. Screening for antioxidative activity in soybean local cultivars in Korea. *Korean Journal of Crop Science*, v. 45, n. 5, p. 328–334, 2000.
- CODEX ALIMENTARIUS METHOD VALIDATION, JOINT FAO/WHO FOOD STANDARDS PROGRAMME, Codex on Methods of Analysis and Sampling, Budapeste, 2001.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento (2017). Acompanhamento da safra brasileira de grãos. Safra 2016/17, junho de 2017. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em: 10 de outubro de 2017.

CRUZ-VERA, M.; LUCENA, R.; CARDENAS, S.; VALCARCEL, M. One-step in-syringe ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*. v. 1216, n. 37, p. 6459-6465, 2009.

CUNHA, M. L. Determinação de resíduos de pesticidas em sedimentos dos principais rios do Pantanal Mato-grossense por CG/EM. 2003. 91 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2003.

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.

DANESHFAR, A., KHEZELI, T., LOTFI, H. J. Determination of cholesterol in food samples using dispersive liquid-liquid microextraction followed by HPLC-UV. *J. Chromatogr. B*, v. 877, p. 456–460, 2009.

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. *Ecotoxicol. e Meio Ambiente*, v.13, p.53-58, 2003.

DUTRA DE OLIVEIRA, J. E.; SANTOS, A. C.; WILSON, E. D. *Nutrição básica*. São Paulo: Sarvier, 1982. 286p.

ERMER, J & MILLER, J. H. *Method Validation in Pharmaceutical Analysis. A Guide to Best Practice*, Wiley: Weinheim, 2005.

EUROPEAN COMISSON. DIRECTORATE-GENERAL FOR HEALTHG AND FOOD SAFETY. SANTE/11813/2017. *Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed*, 2018.

FAO (Food and Agriculture Organisation of the United Nations), 2005. Disponível

em: <<http://faostat.fao.org/faostat/collections?hasbulk=0&subset=FoodQuality&language=EN>>. Acesso em: 15 jan 2017.

FARAHANI, H.; NOROUZI, P.; DINARVAND, R.; GANJALI, M. R. Development of dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry as a simple, rapid and highly sensitive method for the determination of phthalate esters in water samples. *J. Chromatogr., A*, v. 1172, p. 105-112, 2007.

FARAJZADEH, M. A.; BAHRAM, M.; JÖNSSON, J. A. Dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography-diode array detection as an efficient and sensitive technique for determination of antioxidants. *Anal. Chim. Acta*, v. 591, p. 69-79, 2007

FARAJZADEH, M. A.; DJOZAN, D.; MOGADDAN, M. R. A. Extraction and preconcentration technique for triazole pesticides from cow milk using dispersive liquid-liquid microextraction followed by GC-FID and GC-MS determinations. *Journal of Separations Science*, v. 34, p. 1309-1316, 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. *J Chromatogr 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.

GARCÍA-LÓPEZ, M.; RODRÍGUEZ, I.; CELA, R. Development of a dispersive liquid-liquid microextraction method for organophosphorus flame retardants and plasticizers determination in water samples *J. Chromatogr., A*, v. 1166, p. 9-15, 2007.

GARP – ASSOCIAÇÃO GRUPO DE ANALISTAS DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS. *Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos*, 1999.

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., AND MANLEY, N.B. Pesticide Residues in Food and Cancer Risk: A Critical Analysis. In: *Handbook of Pesticide Toxicology, Second Edition* (R. Krieger, ed.), San Diego, CA: Academic Press, pp. 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.

HARRIS, D. *Análise Química Quantitativa*. 8. ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, 2012.

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.

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.

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.

HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. *LC/GC International*, v. 11, p. 96-105, 1998.

IÇIER, F.; GÜNDÜZ, G. T.; YILMAZ, B.; MEMELI, Z. Changes on some quality characteristics of fermented soy milk beverage with added apple juice. *Food Sci Technol LEB*, v. 63, p. 57–64, 2015.

IKEDA, Y., IKI, M., MORITA, A., KAJITA, E., KAGAMIMORI, S., KAGAWA, Y., & YONESSHIMA, H. Intake of fermented soybeans, natto, is associated with reduced bone loss in postmenopausal women: Japanese population-based osteoporosis (JPOS) study. *The Journal of Nutrition*, v. 136, n. 5, p.1323–1328, 2006.

INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL) DOQ-CGCRE-008: Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos – Revisão 04. Brasília, 2011. 20 p.

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.

KARAMI-OSBOO, R.; SHOJAEI, M. H.; MIRI, R.; KOBARFARD, F.; JAVIDNIA, K. Simultaneous determination of six fluoroquinolones in milk by validated QuEChERS-DLLME HPLC/FLD. *Analytical Methods*, v.6, n.15, p.5632–5638, 2014.

KOCUROVA L, BALOGH I, SANDREJOVA J, ANDRUCH V. Recent advances in dispersive liquid-liquid microextraction using organic solvents lighter than water. A review. *Microchemical Journal*, v. 102, p. 11-7, 2012.

LANÇAS, F. M. *Validação de Métodos Cromatográficos de Análise*. São Carlos: RiMa, 2004, 62 p.

LEANDRO, C. C.; FUSSELL, R. J.; KEELY B. J. Determination of priority pesticides in baby foods by gas chromatography tandem quadrupole mass spectrometry. *Journal Chromatography A*, v. 1085, p. 207-212, 2005.

LIANG, J.; ZHANG, X.; ZHOU, Y.; HU, Q. Determination of trace lead in environmental samples by flow injection and hydride generation atomic absorption spectrometry. *Asian Journal of Chemistry*. v. 20, n. 1, p. 599-607, 2008.

LIU, K. Soybean: chemistry, technology and utilization. Gaithersburg, Maryland:Aspen, 1999. p.137-165.

LIU, X.; ZHAO, A.; ZHANG, A.; LIU, H.; XIAO, W.; WANG, C.; WANG, X. "Dispersive liquid-liquid microextraction and gas chromatography-mass spectrometry determination of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenylethers in milk" *Journal of Separation Science*, v. 34, n. 9, p.1084–1090, 2011.

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-segurancaalimentos-bebidas/alimentos/residuos-e-contaminantes>>. Acesso em: 10 de novembro de 2017.

MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Manual de garantia da qualidade analítica: áreas de identidade e qualidade de alimentos e de insumos / Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília : MAPA/ACS, 2015. 51 p.

MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Agrotóxicos. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/mercado-interno/agrotoxicos>>. Acesso em: 19 maio 2016.

MATSADIQ G, HUA HL, RENB HB, ZHOUA YW, LIUA L, CHENGA J. Quantification of multi-residue levels in peach juices, pulps and peels using dispersive liquid–liquid

microextraction based on floating organic droplet coupled with gas chromatography-electron capture detection. *J Chromatogr B*, v. 879, p. 2113–2118, 2011.

MAY, M. M. Determinação multirresíduo de agrotóxicos em bebidas à base de soja empregando método quechers e UHPLC-MS/MS. Dissertação de Mestrado, 99 p., UFSM, Santa Maria, 2016.

MESSINA, M. The science behind soyfoods. In: Soybean research conference, 7.; INTERNATIONAL SOYBEAN PROCESSING AND UTILIZATION CONFERENCE, 4; Congresso mundial de soja, 3. 2004, Foz do Iguaçu. Proceedings... Foz do Iguaçu: Embrapa Soja, 2004. p.73–82.

MILLS, P. A.; ONLEY, J. J.; GAITHER, R. A. Rapid method for chlorinated pesticide residues in nonfatty foods. *J. Assoc. J. Assoc. Official Agr. Chemists*, v. 46, n. 186, 1963).

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Portaria n 518, de 25 de março de 2004. Disponível em: <http://dtr2001.saude.gov.br/svs/pub/GVE/GVE0515F.htm>. Acesso em: 27 novembro 2017.

MMA - Ministério do Meio Ambiente. Perfil nacional da gestão de substâncias químicas - PNGSQ. Programa de proteção e melhoria na qualidade ambiental. Brasília, v. 3, p. 68-73, 2003.

MOREIRA, B. J.; YOKOYA, J. M. C.; GAITANI, C. M. Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME): fundamentos, inovações e aplicações biológicas. *Scientia Chromatographica*, 2014; 6(3):186-204

NAGARAJU, D.; HUANG, S. Determination of triazine herbicides in aqueous samples by dispersive liquid-liquid microextraction with gas chromatography-ion trap mass spectrometry. *J. Chromatogr., A* 2007, v. 1161, 89-97.

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.

OMS – Organização Mundial da Saúde. *The WHO Recommended Classification of Pesticides of Pesticides by Hazards and Guidelines to Classification 20094*. Geneva, Switzerland 2004.

OSOSKI, A. L. & KENNELLY, E. J. Phytoestrogens: a review of the present state of research. *Phytotherapy Research*, v. 17, n. 8, p. 845–869, 2003.

PANG, G. F., *et al.*, Validation study on 660 pesticide residues in animal tissues by gel permeation chromatography cleanup/gas chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal Chromatography A*, v. 1125, p.1-30, 2006.

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.

PICÖ, Y., FONT, G., MOLTÓ, J. C., *et al.*, *Journal Chromatography A*, v. 885, p. 153-173, 2000.

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. *et al.* QuEChERS – Um método modern de preapro de amostras para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v.32, n. 6, p. 1620-1634, 2009.

REZAEI, M.; ASSADI, Y.; HOSSEINIA, M.; AGHAEE, E.; AHMADI, F.; BERIJANI, S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*, v. 1116, ed. 1-2, p. 1-9, 2006.

REZAEI, M.; YAMINI, Y.; FARAJI, M. Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. *Journal of Chromatography A*, 1217, 2342-2357, 2010.

REZAEI, F.; BIDARI, A.; BIRJANDI, A.; HOSSEINI, M.; ASSADI, Y. Development of a dispersive liquid-liquid microextraction method for the determination of polychlorinated biphenyls in water. *Journal of Hazardous Materials*, v. 158, ed. 2-3, p. 621-627, 2008.

RIBANI, M., COLLINSA, C. H.; BOTTOLIA, C. B. G. Validation of chromatographic methods: Evaluation of detection and quantification limits in the determination of impurities in omeprazole. *Journal of Chromatography A*, v. 1156, p. 201–205, 2007.

RIBANI, M.; BOTTOLIA, C. B. G.; COLLINSA, C. H.; *et al.*, Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIZZETTI TM, KEMMERICH M, MARTINS ML, PRESTES OD, ADAIME MB, 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 Chem*, 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.

SANCHES, S. M.; SILVA, C. H. T.P.; CAMPOS, S. X.; *et al.*, Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. *Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v. 13, n. 53, 2003.

SARAFRAZ-YAZDI, A.; AMIRI, A. Liquid-phase microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 29, n. 1, p. 1-14, 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.

USDA – United States Department 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 novembro de 2017.

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.

ZHAO, E.; ZHAO, W.; HAN, L.; JIANG, S.; ZHOU, Z. Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the analysis of organophosphorus pesticides in watermelon and cucumber. *Journal of Chromatography A*, v. 1175, p. 137-140, 2007.

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*, v. 75, p. 197-208, 2016.

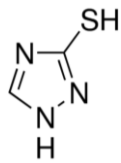
WILKOWSKA, A. & BIZIUK, M. Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. *Food Chemistry*, v. 125, p. 803–812, 2011.

10 ANEXOS

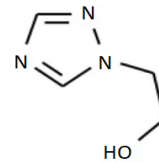
ANEXO 1

Fórmulas estruturais dos pesticidas estudados nesse trabalho.

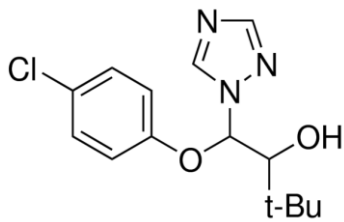
1H-1,2,4-Triazole



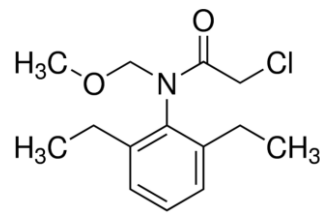
1H-1,2,4-triazole-1- etanol



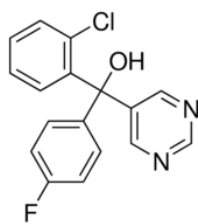
Triadimenol



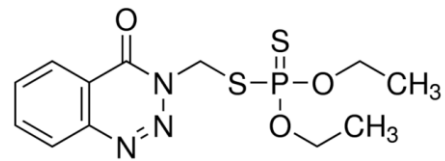
Alachlor



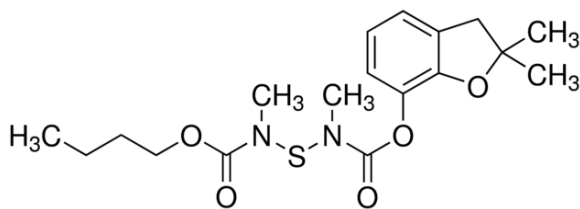
Nuarimol



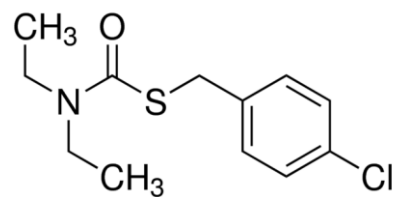
Azinphos-ethyl



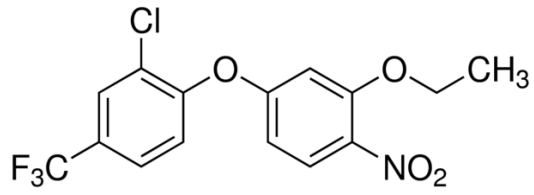
Furathiocarb



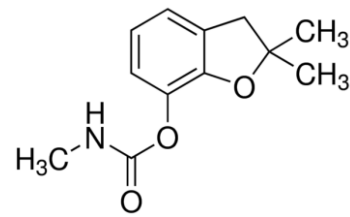
Benthiocarb



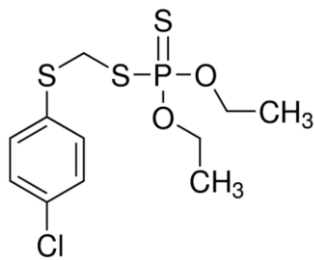
Oxyfluorfen



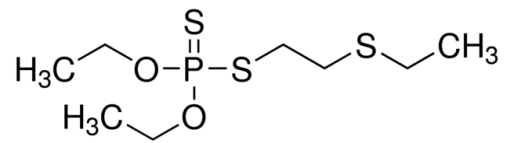
Carbofurane



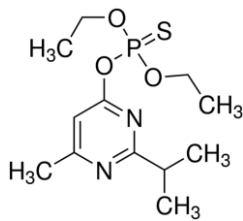
Carbophenothion



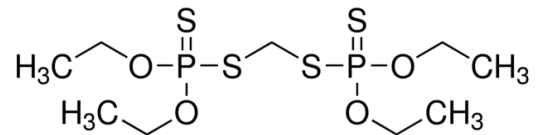
Disulfoton



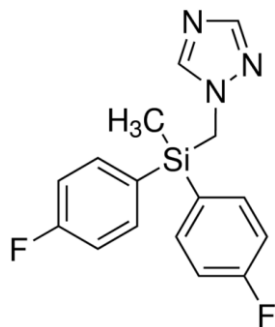
Diazinone



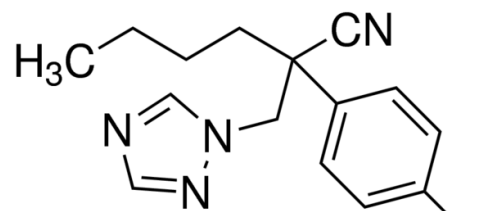
Ethion



Flusilazole

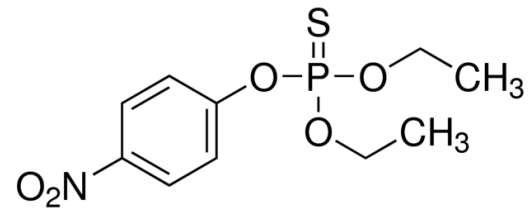
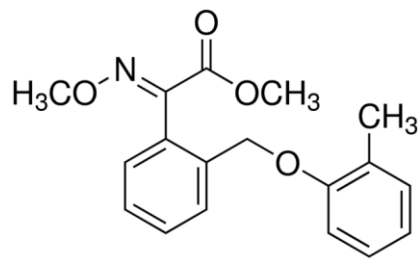


Myclobutanil

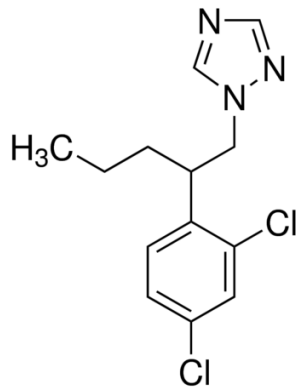


Parathion

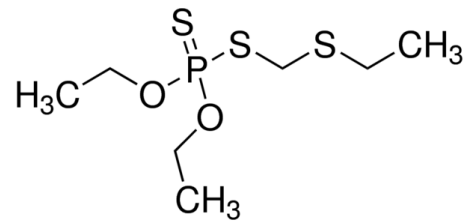
Kresoxim-methyl



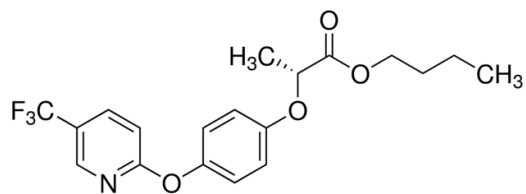
Penconazole



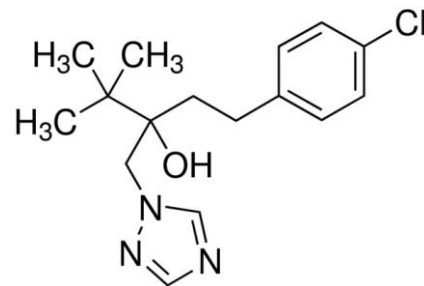
Phorate



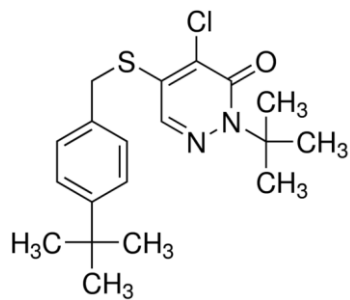
Fluazifop-p-butyl



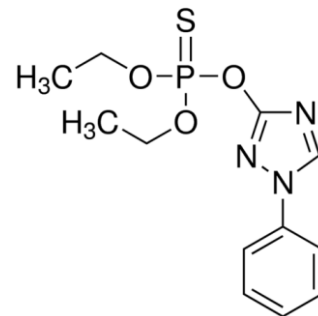
Tebuconazole



Pyridaben



Triazophos



ANEXO 2 - Normas revista *Food Chemistry*.

Guide for Authors updated September 2017



Introduction

The Aims and Scope of Food Chemistry are assessed and modified on an annual basis to reflect developments in the field. This means that research topics which may have been deemed in scope in previous years may now fall outside of the scope of the journal as our scientific and technical understanding of the field evolves and topics become less novel, original or relevant to Food Chemistry.

Ten essential rules to ensure your manuscript is handled promptly

1. The manuscript fits the Aims and Scope of the journal (<http://www.journals.elsevier.com/food-chemistry>)
2. Manuscript is in accordance with ARTICLE TYPE - GUIDELINES and includes a hypothesis statement(<http://www.elsevier.com/journals/food-chemistry/0308-8146/guide-for-authors#14000>)
3. The text is written in good English. Authors who feel their manuscript might require editing to meet correct scientific English requirements may wish to use an English Language Editing service such as the one available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>).
4. Manuscript text is divided into numbered sections; line and page numbers are added and text is double-spaced
5. An ethical statement is required for experiments involving humans or animals
6. Conflict-of-interest statement is included at the end of the manuscript
7. The number of figures and tables combined does not exceed a total of six; additional tables and figures can be submitted as supplementary material.
8. All relevant sources (i.e. peer-reviewed articles, websites, books etc.) should be included in the Reference list.
9. Cover letter is prepared, introducing your article and explaining the novelty of the research
10. Highlights identify important outcomes of your work and stand alone (i.e. do not require someone to read the article to understand what they mean). These are presented in 3-5 points, 85 characters each)

Submission checklist

This checklist allows authors to ensure that the manuscript meets the Food Chemistry requirements before submission. Checklist can also be downloaded here [here](#)

1) Study contents:

The Authors should ensure that

1. The manuscript fits within [Aims & Scope](#) of Food Chemistry. Please note that the Aims and Scope are regularly updated.
2. The research is **novel** and has **not been published previously** - see "Responsible research publication: international standards for authors" from COPE for more information http://publicationethics.org/files/International%2ostandards_authors_for%2owebiste_11_Nov_2011_o.pdf
3. **Ethical consent** has been obtained in case of work on animals and/or humans.

2) Manuscript preparation:

The Authors should ensure that

1. The formatting of the manuscript follows the requirements of the Guide for Authors
2. The language follows the requirements of the Guide for Authors
3. The number of words and of figures/tables is within limits:
 - Research article: 7500 words, 6 tables and figures combined
 - Review article: 10 000 words, 6 tables and figures combined
 - Short communication: 3000 words, 6 tables and figures combined

More tables and figures? Submit as [supplementary material](#)

4. The **title page** contains title, author names, affiliations and corresponding author telephone. **Email addresses are required for ALL authors. Authors must provide and use a unique, individual e-mail address and not one that is shared with another author registered in the submission system, or a department. Author names - please ensure that names are listed in the order first name/FAMILY NAME (e.g. Marie CURIE) - this will ensure they are listed correctly in indexing services..**
5. The **highlights** are provided (3-5 bullet points, max 85 characters each including spaces).
6. The manuscript contains a **conflict of interest** statement (before references)
7. Continuous **line numbering** is provided throughout the manuscript (including captions and references); **page numbering** is provided.
8. All [sources](#) (references) are provided in alphabetical order
9. Figures and tables (6 combined) include clear **legends**.
10. The manuscript contains appropriate **ethical approval** and **informed consent** (if applicable, include statement).
11. Food Chemistry now requires the inclusion of a hypothesis statement in the Introduction, and response in the Discussion. Please ensure this is included

3) Before submission:

1. **Manuscript** file is provided as a Microsoft Word file.
2. A **cover letter** is included.

3. Three or more suggested **reviewers** are provided (including affiliation and professional email address), **at least two of which are from a different country than the Authors and none from the same institution.**
4. **Keywords** are provided.

Now you are ready to submit at <http://ees.elsevier.com/foodchem>

Types of paper

Original research papers; review articles; rapid communications; short communications; letters to the Editor.

1. Research papers - original full-length research papers that have not been published previously, except in a preliminary form, and should not exceed 7,500 words from introduction to conclusion (not including references) (including no more than six tables and figures combined - additional tables and figures can be submitted as supplementary material). Research papers should not contain more than 40 references.
2. Review articles - will be accepted in areas of topical interest, will normally focus on literature published over the previous five years, and should not exceed 10,000 words from introduction to conclusion (not including references) (including allowance for no more than six tables and figures combined). Review articles should not contain more than 120 references. If it is felt absolutely necessary to exceed these numbers (tables, figures, references), please contact the editorial office for advice before submission.
3. Short communications - Short communications of up to 3000 words from introduction to conclusion (not including references), describing work that may be of a preliminary nature but merits publication. These papers should not contain more than 40 references.
4. Viewpoints - Authors may submit viewpoints of no more than 1200 words on any subject covered by the Aims and Scope.
5. Letters to the Editor - Letters are published from time to time on matters of topical interest.



Before You Begin

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Another useful source of guidance is "Responsible research publication: international standards for authors" from COPE (http://publicationethics.org/files/International%20standards_authors_for%20web_site_11_Nov_2011_o.pdf).

Guidelines in the US and Canada, Europe and Australia specifically state that hypothermia (use of ice slurries) is not an acceptable method for killing fish in the research environment.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

Conditions of authorship, and changes to authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following:

- the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data
- drafting the article or revising it critically for important intellectual content
- final approval of the version to be submitted.

If all 3 of these conditions are not met, a person does not qualify as an author, and any contribution made by them should be mentioned in the Acknowledgements section of the manuscript.

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition

or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

It is the policy of Food Chemistry that no additions, deletions or changes to authorship of a paper will be permitted after the article is accepted.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

Subscription or open access – your choice

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article (subscription or open access), the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 2800**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [green open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during

submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more](#).

This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Researcher Academy

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Authors must provide and use an email address unique to themselves and not shared with another author registered in the submission system, or a department.

Referees

Authors are required to submit with their articles, the names, complete affiliations (spelled out), country and contact details (including current and valid (preferably business) e-mail address) of three potential reviewers. Email addresses and reviewer names will be checked for validity. **Your potential reviewers should not be from your institute, and at least two should be from countries other than those of the authors.** Authors should not suggest reviewers with whom they have collaborated within the past two years. Your submission will be rejected if these are not supplied. Names provided may be used for other submissions on the same topic. Reviewers must have specific expertise on the subject of your article and/or the techniques employed in your study. Briefly state the appropriate expertise of each reviewer (not simply "has an interest in this topic").

Review Policy

A peer review system involving at least two reviewers is used to ensure high quality of manuscripts accepted for publication. The Managing Editor and Editors have the right to decline formal review of a manuscript when it is deemed that the manuscript

1. is on a topic outside the scope of the Journal;
2. makes no contribution to the advancement of the chemistry of foods
3. is lacking technical or scientific merit;
4. is focused on foods or processes that are of narrow regional scope and significance;
5. is fragmentary and providing marginally incremental results;
6. reports only routine work (lacks novelty) or
7. is poorly written.



Preparation

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. [More information on types of peer review.](#)

Use of wordprocessing software

General: Manuscripts must be typewritten, double-spaced with 2 cm margins. Each page must be numbered, and lines must be consecutively numbered from the start to the end of the manuscript. Good quality printouts with a font size of 12 or 10 pt are required. The corresponding author should be identified (include a valid E-mail address). Full postal and email addresses must be given for all co-authors. Authors should consult a recent issue of the journal for style if possible. The Editors reserve the right to adjust style to certain standards of uniformity.

Article structure

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text (*Introduction, Material and Methods, Results, Conclusion*), Acknowledgements, Appendix, References, Figure Captions. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers. The title of the paper should unambiguously reflect its contents.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the full given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Please ensure that names are listed in the order first name/FAMILY NAME (e.g. Marie CURIE) - this will ensure they are listed correctly in indexing services. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate the one author who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

The abstract should not exceed 150 words.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core (most important) findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view [example Highlights](#) on our information site. Do not use abbreviations in the highlights and ensure that highlights can be understood independent of the manuscript.

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section

numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Hypotheses

Nearly all scientific papers benefit from inclusion of a statement of hypothesis. Such statements should be clear, concise, and declarative. The statement should describe the one or more key hypotheses that the work described in the manuscript was intended to confirm or refute. Inclusion of a hypothesis statement makes it simple to contrast the hypothesis with the most relevant previous literature and point out what the authors feel is distinct about the current hypothesis (novelty). It also permits the authors to describe why they feel it would be important to prove the hypothesis correct (significance). The hypothesis shall be stated in the introductory section, and the conclusion section shall include your conclusion about whether the hypothesis was confirmed or refuted, as well as describing any new hypotheses generated by the work described. Here is an example of a famous, excellent hypothesis statement; declarative, concise, clear, and testable: **"Equal volumes of gases, at the same temperature and pressure, contain equal numbers of molecules."** Lorenzo Romano Amedeo Carlo Avogadro di Quareqa e di Carreto (Avogadro), 1811

Chemical compounds

You can enrich your article by providing a list of chemical compounds studied in the article. The list of compounds will be used to extract relevant information from the NCBI PubChem Compound database and display it next to the online version of the article on ScienceDirect. You can include up to 10 names of chemical compounds in the article. For each compound, please provide the [PubChem CID](#) of the most relevant record as in the following example: Glutamic acid (PubChem CID:611). Please position the list of compounds immediately below the 'Keywords' section. It is strongly recommended to follow the exact text formatting as in the example below:
 Chemical compounds studied in this article
 Ethylene glycol (PubChem CID: 174); Plitidepsin (PubChem CID: 44152164);
 Benzalkonium chloride (PubChem CID: 15865)
[More information.](#)

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI. Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit 'billion' is ambiguous and should not be used. Abbreviations for units should follow the suggestions of the British Standards publication BS 1991. The full stop should not be included in abbreviations, e.g. m (not m.), ppm (not p.p.m.); % and '/' should be used in preference to 'per cent' and 'per'. Where abbreviations are likely to cause ambiguity or might not be understood easily by an international readership, units should be spelled out in full.

Statistics

Appropriate application of statistical analysis should be applied throughout the article.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
 - Embed the used fonts if the application provides that option.
 - Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
 - Number the illustrations according to their sequence in the text.
 - Use a logical naming convention for your artwork files.
 - Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Figures

Photographs, charts and diagrams are all to be referred to as "Figure(s)" and should be numbered consecutively in the order to which they are referred. All illustrations should be clearly marked with the figure number and the first author's name.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic

artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):
 EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.
 TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure Captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the

data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Example: CTAHR (College of Tropical Agriculture and Human Resources, University of Hawaii). Tea (*Camellia sinensis*) a New Crop for Hawaii, 2007. URL http://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/tea_04_07.pdf. Accessed 14.02.11.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#) and [Zotero](#), as well as [EndNote](#). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link: <http://open.mendeley.com/use-citation-style/food-chemistry>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. See Types of Paper for reference number limits. In the text refer to the author's name (without initials) and year of publication (e.g. "Steventon, Donald and Gladden (1994) studied the effects..." or "...similar to values reported by others (Anderson, Douglas, Morrison & Weiping, 1990)..."). For 2-6 authors all authors are to be listed at first citation. At subsequent citations use first author et al.. When there are more than 6 authors, first author et al. should be used throughout the text. The list of references should be arranged alphabetically by authors' names and should be as full as possible, listing all authors, the full title of articles and journals, publisher and year. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of authors' names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.

Reference style

Text: Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Sixth Edition, ISBN 978-1-4338-0561-5, copies of which may be [ordered online](#) or APA Order Dept., P.O.B. 2710, Hyattsville, MD 20784, USA or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, UK.

List: references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications*, 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). *The elements of style*. (4th ed.). New York: Longman, (Chapter 4).

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S. Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281–304). New York: E-Publishing Inc.

Reference to a website:

Cancer Research UK. Cancer statistics reports for the UK. (2003). <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> Accessed 13 March 2003.

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T. (2015). *Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions*. Mendeley Data, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Reference to a conference paper or poster presentation:

Engle, E.K., Cash, T.F., & Jarry, J.L. (2009, November). The Body Image Behaviours Inventory-3: Development and validation of the Body Image Compulsive Actions and Body Image Avoidance Scales. Poster session presentation at the meeting of the Association for Behavioural and Cognitive Therapies, New York, NY.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. [More information and examples are available](#). Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research

publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. Before submitting your article, you can deposit the relevant datasets to *Mendeley Data*. Please include the DOI of the deposited dataset(s) in your main manuscript file. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon

publication. You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee of 500 USD is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your Data in Brief.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

Interactive plots

This journal enables you to show an Interactive Plot with your article by simply submitting a data file. [Full instructions](#).

After submission

Click [HERE](#) to see what may happen to your manuscript once it is submitted.



After Acceptance

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Check carefully before

replying. This is your last opportunity to correct errors. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.



Author Inquiries

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch. You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).