



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS (UFG)
INSTITUTO DE QUÍMICA (IQ)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA (PPGQ)

DANIEL DE ALMEIDA SOARES

**Aplicações da cromatografia líquida e espectrometria
de massas na análise de contaminantes em amostras de
leite bovino e arroz para fins de controle de qualidade e
segurança em alimentos**

GOIÂNIA

2024



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

☐ Dissertação ☒ Tese ☐ Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

Daniel de Almeida Soares

3. Título do trabalho

Aplicações da cromatografia líquida e espectrometria de massas na análise de contaminantes em amostras de leite bovino e arroz para fins de controle de qualidade e segurança em alimentos

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Andrea Rodrigues Chaves, Professor do Magistério Superior**, em 13/08/2024, às 14:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniel De Almeida Soares, Discente**, em 04/09/2024, às 10:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4696531** e o código CRC **5E440840**.

DANIEL DE ALMEIDA SOARES

**Aplicações da cromatografia líquida e espectrometria
de massas na análise de contaminantes em amostras de
leite bovino e arroz para fins de controle de qualidade e
segurança em alimentos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química, do Instituto de Química, da Universidade Federal de Goiás (UFG) como requisito para obtenção do título de Doutor em Química.

Área de concentração: Química

Orientadora: Professora Doutora Andréa Rodrigues Chaves

GOIÂNIA

2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Soares, Daniel de Almeida

Aplicações da cromatografia líquida e espectrometria de massas na
análise de contaminantes em amostras de leite bovino e arroz para
fins de controle de qualidade e segurança em alimentos [manuscrito] /
Daniel de Almeida Soares. - 2024.

CLXXIII, 173 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Andréa Rodrigues Chaves.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Química (IQ), Programa de Pós-Graduação em Química, Goiânia, 2024.
Bibliografia.

Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas,
lista de figuras, lista de tabelas.

1. leite. 2. arroz. 3. cromatografia líquida. 4. espectrometria de
massas. I. Chaves, Andréa Rodrigues, orient. II. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA

ATA IQ 181/2024

Ata nº 181 da sessão da Defesa de Doutorado de **Daniel de Almeida Soares**, que confere o título de **Doutor em Química**, na área de concentração em **Química**.

Aos **28 (vinte e oito) dias do mês de março de 2024 (dois mil e vinte e quatro)**, a partir das **14h00m**, no **Anfiteatro do IQ II**, realizou-se a sessão pública da Defesa de Doutorado intitulada "**Aplicações da cromatografia líquida e espectrometria de massas na análise de contaminantes em amostras de leite bovino e arroz para fins de controle de qualidade e segurança em alimentos**". Os trabalhos foram instalados pela Orientadora, **Profª. Drª. Andréa Rodrigues Chaves (UFG)**, com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: **Profª. Drª. Cíntia Silva Minafra e Rezende (UFG)**, **Prof. Dr. Leomir Aires Silva de Lima (Faculdade Estácio)**, **Profª. Drª. Núbia Natália de Brito (UFG)** e **Profª. Drª. Maria Isabel Ribeiro Alves (UFG)**. Durante a arguição os membros da banca não fizeram sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Defesa de Doutorado, tendo sido o candidato **aprovado** pelos seus membros. Proclamados os resultados pela **Profª. Drª. Andréa Rodrigues Chaves**, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos 28 (vinte e oito) dias do mês de março de 2024 (dois mil e vinte e quatro).



Documento assinado eletronicamente por **Andrea Rodrigues Chaves, Professor do Magistério Superior**, em 28/03/2024, às 18:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Leomir Aires Silva de Lima, Usuário Externo**, em 29/03/2024, às 11:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Nubia Natalia De Brito, Professor do Magistério Superior**, em 29/03/2024, às 18:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Isabel Ribeiro Alves, Professor do Magistério Superior**, em 01/04/2024, às 15:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cintia Silva Minafra E Rezende, Professora do Magistério Superior**, em 03/04/2024, às 18:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4473038** e o código CRC **FC8080B3**.

Dedico este trabalho aos ciclos que se iniciam e se encerram:

A Maitê Soares de Sá e Luísa Soares de Sá.

A Welinton Ribamar Lopes (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Rubizair e Marlene, que sempre me apoiaram em toda minha trajetória. À minha irmã Caroline, pela confiança e companheirismo, por estar sempre torcendo pelas minhas conquistas. Pelo apoio e incentivo incondicional.

Agradeço à Prof^a Dr^a Andréa Rodrigues Chaves pela oportunidade de tê-la como orientadora de doutorado e por sempre acreditar em mim. Obrigado pelas conversas sadias, pelas orientações e pela motivação. Te admiro pela sua inteligência e o amor pelo que faz. Agradeço também aos meus orientadores de IC (Prof. Dr Olacir Alves Araújo) e mestrado (Prof^a Dr^a Araceli Aparecida Seolatto) que tanto contribuíram para a conquista deste título.

Agradeço ao Instituto de Química da UFG. Quero agradecer também a Prof^a Dr^a Rosineide Simas pelo apoio e orientações. Agradeço ao Lacem (Prof Dr^o Boniek Vaz), CRTI (Prof^a Dr^a Cecília, Dr^a Ana Paula e Francielle), Embrapa Arroz e Feijão por disponibilizar os equipamentos e recursos para o desenvolvimento do trabalho. Agradeço também as parcerias de trabalho: Dr^a Damila, Prof Dr^o Luiz Antônio Franco, Prof^a Dr^a Virgínia Damin, Dr^a Melissa Soler.

A todos os Amigos das Antigas, que desde sempre me apoiam e incentivam. Marcus Vinícius, Nayara e Esther. E aos agregados também. Aos outros amigos: Gil, PS, Valtercides, Aracelle, muito obrigado por me ouvirem, incentivarem e aconselharem.

A todos os colegas do Lacem, em especial, Dr^o Gabriel Franco e Dr^a Gesiane pela amizade. Agradeço o apoio dos ICs Gabs Henry e Allyster.

Aos companheiros de caminhada, aos acropolitanos do coração, meu muito obrigado por todo ensinamento, apoio e exemplo.

Agradeço a instituição onde exerço meu papel como professor, IFG Câmpus Luziânia.

Um agradecimento especial para uma das pessoas mais importantes que já passaram pela minha vida, Welinton, você foi um dos responsáveis pela finalização desse processo de doutoramento. Obrigado por sempre acreditar em mim e espero que onde estiver você esteja bem. Obrigado por me ensinar tantas coisas e ser um exemplo de cientista e de ser humano.

“O tempo muito me ensinou: Ensinou a amar a vida, não desistir de lutar, renascer na derrota, renunciar às palavras e pensamentos negativos, acreditar nos valores humanos, e a ser otimista. Aprendi que mais vale tentar do que recuar... Antes acreditar do que duvidar, que o que vale na vida, não é o ponto de partida e sim a nossa caminhada.”

Cora Coralina

“Se recuperarmos a atualmente quase perdida arte de encontrar Deus, libertar-nos-emos de muitas limitações, racismos e fanatismos. Libertar-nos-emos da angústia e seremos naturalmente voluntariosos, bons e justos.”

Jorge Angel Livraga

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura química do antibiótico Ceftiofur.	33
Figura 2. Esquema de uma ponteira DPX (PINTO; QUEIROZ, 2015).	35
Figura 3. Esquema genérico das principais partes de um espectrômetro de massas.	36
Figura 4. Esquema de um analisador do tipo triplo quadrupolo (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).	37
Figura 5. Intensidades obtidas no experimento de PSI-MS (barras em vermelho) para o CFT em leite bovino na concentração de 1000 ng.mL ⁻¹ . NM – papel não modificado; M1 – papel modificado 1 (solução de pirrol em ACN com HNO ₃); M2 - papel modificado 2 (solução de pirrol em água com NaClO); M3 - papel modificado 3 (solução de pirrol com FeCl ₃ .2H ₂ O).	51
Figura 6. (a) Cromatograma (b) Ion molecular para o analito de interesse, ceftiofur na concentração de 100 ng.mL ⁻¹ com detecção em equipamento do tipo triplo quadrupolo e (c) fragmentação da molécula de CFT na concentração de 100 ng.mL ⁻¹	53
Figura 7. Comparativo das intensidades de sinal variando-se as energias de colisão no espectrômetro de massas. Infusão direta das soluções de concentração de 100 ng.mL ⁻¹	54
Figura 8. Comparação da Extração 1 com o Padrão de CFT em leite bovino.	55
Figura 9. Comparação das sete frações obtidas na Extração 2 com o Padrão de CFT em leite bovino.	56
Figura 10. Comparação das quatro frações obtidas na Extração 3 com o Padrão de CFT em leite bovino.	56
Figura 11. Comparação da Extração 4 com o Padrão de CFT em leite bovino.	57
Figura 12. Comparação das quatro frações obtidas na Extração 5 com o Padrão de CFT em leite bovino.	58
Figura 13. Comparação das quatro frações obtidas na Extração 6 com o Padrão de CFT em leite bovino.	58
Figura 14. Comparação das cinco frações obtidas na Extração 7 com o Padrão de CFT em leite bovino.	59

Figura 15. Comparação de quatro ensaios obtidos na Extração 8 e o Padrão de CFT em leite bovino.	60
Figura 16. Comparação das cinco frações obtidas na Extração 9 com o Padrão de CFT em leite bovino.	60
Figura 17. Comparação da Extração 10 com o Padrão de CFT em leite bovino.	61
Figura 18. Comparação das duas frações obtidas na Extração 11 com o Padrão de CFT em leite bovino.	62
Figura 19. Comparação do Teste 12 com o Padrão de CFT em leite bovino.	62
Figura 20. Comparação das áreas de pico obtidas nas três frações extraídas no experimento.	63
Figura 21. Curva de calibração para o CFT.	64
Figura 22. Concentração de CFT em amostras reais de leite bovino determinada via LC-MS/MS. A linha tracejada representa o valor LMR do antibiótico no leite.	67
Figura 23. Concentração de CFT para 6 vacas submetidas à aplicação do medicamento durante 0, 24 e 48 h. Os círculos em vermelho correspondem ao momento da aplicação do antibiótico nas vacas.	67
Figura 24. Percentual de acúmulo do CFT em leite bovino.	68
Figura 25. Estrutura da Embalagem Cartonada. Fonte: (ECOLIFE TETRA-PAK, 2021).	73
Figura 26. Estruturas químicas dos bisfenóis (A e S).	75
Figura 27. Esquema geral do método de ionização por PSI.	77
Figura 28. (a) Papel cromatográfico e embalagem de leite longa vida cortados em formato triangular e (b) Instrumentação para o experimento de PSI-MS.	81
Figura 29. Espectros de fragmentação de (a) BPA e (b) BPS no modo negativo.	83
Figura 30. Cromatograma de íons totais obtidos para a técnica de PSI-MS/MS na análise dos bisfenóis ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em metanol.	84
Figura 31. Intensidades de íons BPA (a) e BPS (b) obtidas para cinco variedades diferentes de embalagens de leite e do mesmo lote de fabricação de leite (Amostras 6 e 7). As linhas pontilhadas indicam as intensidades de íons obtidas com	

BPA e BPS a 1 ou 10 ng.mL ⁻¹ . Cada avaliação de amostra de caixa foi replicada (n = 5).	85
Figura 32. Curvas analíticas para (a) BPA e (b) BPS.	88
Figura 33. Concentrações obtidas de BPA e BPS em amostras de leite longa vida.	91
Figura 34. Estruturas químicas do (a) clomazone, (b) imazapir e (c) imazapic.	98
Figura 35. Representação esquemática da HF-LPME do tipo “U” (A) e do tipo “haste” (B). (OLIVEIRA et al., 2008) – Adaptado.	102
Figura 36. Extração em HF-LPME: sistema bifásico (A) e sistema trifásico (B) (OLIVEIRA et al., 2008).	102
Figura 37. Sistema de extração bifásico.	106
Figura 38. Condições do experimento de adição de sal.	107
Figura 39. Sistema trifásico.	108
Figura 40. Espectro de massas fullscan para os herbicidas clomazone, imazapir e imazapic respectivamente obtido em equipamento do tipo ion trap.	111
Figura 41. Fragmentação (MS/MS) dos herbicidas: (a) clomazone, (b) imazapir, (c) imazapic, respectivamente.	112
Figura 42. Curva de calibração para clomazone, imazapir e imazapic em solução padrão na faixa linear de 200-1200 ng.mL ⁻¹ .	113
Figura 43. Curva de calibração para clomazone, imazapir e imazapic em solução padrão na faixa linear de 1-150 ng.mL ⁻¹ .	114
Figura 44. Intensidades obtidas dos analitos em cada experimento.	115
Figura 45. Intensidade dos analitos nas análises próximas ao LMR.	117
Figura 46. Valores de intensidade após alteração de pH e adição de sal.	118
Figura 47. Valores de intensidade para cada analito após teste trifásico.	119
Figura 48. Comparação entre os teste realizados.	120
Figura 49. Novo planejamento fatorial em (a) octanol e (b) decanol.	121
Figura 50. Sistema trifásico utilizando decanol.	122
Figura 51. Sistema trifásico otimizado (concentrações dos analitos no LMR, ou seja, clomazone = 10 ng.mL ⁻¹ e imazapir e imazapic = 50 ng.mL ⁻¹).	123
Figura 52. Analisador do tipo Q-ToF. Fonte: (LANÇAS, 2013).	129

Figura 53. Espectros de massas obtidos para o modo ESI(-) das amostras analisadas da casca (A), casca e grão (B), arroz polido (C) e arroz não polido (D). A primeira linha é referente a amostra sem contaminante, os demais são referentes a amostras com contaminantes.....137

Figura 54. Espectros de massas obtidos para o modo ESI(+) das amostras analisadas da casca (A), casca e grão (B), arroz polido (C) e arroz não polido (D). A primeira linha é referente a amostra sem contaminante, os demais são referentes a amostras com cotaminantes.....138

Figura 55. Gráfico de escores 2D – ESI(-) para amostras de arroz.....141

Figura 56. Gráfico de loadings – ESI(-) para as amostras de arroz.....142

Figura 57. Dendograma para amostras de arroz – ESI(-).....143

Figura 58. Gráfico de escores 2D – ESI(+)......146

Figura 59. Gráfico de loadings – ESI(+)......147

Figura 60. Gráfico 3D sincronizado – ESI(+). 147

Figura 61. Gráfico biplot – ESI(+). 148

Figura 62. Dendograma para amostras de arroz – ESI(+)......149

Lista de Tabelas

Tabela 1. Informações físico-químicas do Ceftiofur.....	33
Tabela 2. Frações de SPE C18 do sobrenadante para Extração 2	42
Tabela 3. Frações de SPE C18 do precipitado para o Teste 2.....	43
Tabela 4. Frações de SPE C18 do sobrenadante e precipitado para a Extração 3.	43
Tabela 5. Frações da extração em DPX do precipitado para a Extração 5.	45
Tabela 6. Parâmetros utilizados no experimento para extração de CFT em leite na Extração 6	46
Tabela 7. Eluições em cartucho C18 para a Extração 7	46
Tabela 8. Solventes utilizados na extração do CFT nos experimentos da Extração 8	47
Tabela 9. Eluições em cartucho C18 para a Extração 9	47
Tabela 10. Fase analisada por LLE e procedimento adotado.....	49
Tabela 11. Resultados da literatura sobre a determinação de BPA e BPS em embalagens de alimentos.....	86
Tabela 12. Figuras de mérito obtidas pela metodologia PSI-MS para análise de BPA e BPS em amostras de leite UHT.....	89
Tabela 13. Níveis de concentração de BPA no leite em diferentes embalagens de acordo com a literatura.....	90
Tabela 14. Informações dos herbicidas clomazone, imazapir, imazapic.	98
Tabela 15. Planejamento fatorial para experimentos de HF-LPME para análise de herbicidas.	105
Tabela 16. Valores de concentrações para teste de LMR.	106
Tabela 17. Valores de pH's da fase doadora.....	108
Tabela 18. Parâmetros avaliados no novo planejamento fatorial.	108
Tabela 19. Novo planejamento Fatorial realizado para octanol e decanol separadamente.	109
Tabela 20. Condições dos experimentos HF-LPME utilizando decanol.....	110
Tabela 21. Linearidade das curvas de calibração dos herbicidas.....	114
Tabela 22. Resultado da ANOVA para o clomazone extraído em ambos os solventes em nível de significância ($\alpha=0,05$).....	115

Tabela 23. Resultado da ANOVA para o imazapir extraído em ambos os solventes em nível de significância ($\alpha=0,05$).....	116
Tabela 24. Resultado da ANOVA para o imazapic extraído em ambos os solventes em nível de significância ($\alpha=0,05$).....	116
Tabela 25. Relação das amostras de arroz analisadas por matriz.	135
Tabela 26. Valores obtidos de variância explicada para PC1 e PC2 para a análise quimiométrica em modo ESI(-).....	139
Tabela 27. Junção do pré-processamento Sem Normalização com as diferentes formas de escalonamento – ESI(-).....	140
Tabela 28. Junção do pré-processamento Normalização pelo quantil com as diferentes formas de escalonamento – ESI(-).	140
Tabela 29. Valores obtidos nos eixos principais (PC1 e PC2) para a análise quimiométrica em modo ESI(+).	144
Tabela 30. Junção do pré-processamento Normalização pela soma com as diferentes formas de escalonamento – ESI(+).	145
Tabela 31. Junção do pré-processamento Normalização pela mediana com as diferentes formas de escalonamento – ESI(+).	145

Lista de Abreviaturas e Siglas

- [M+H]⁺ - Molécula protonada (com H⁺)
- ACN - Acetonitrila
- AHAS - Enzima acetohidroóxido sintase
- ALS - Enzima acetolactato sintase
- AMS - Espectrometria de massas ambiente
- ANOVA - Análise de variância
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ATR - Reflectância Total Atenuada
- BPA - Bisfenol A
- BPS - Bisfenol S
- CE - Concentração experimental (ou analisada)
- CEUA - Comitê de Ética e Pesquisa com o uso de animais
- CFT - Ceftiofur
- CID - Dissociação induzida por colisão
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento
- CT - Concentração teórica
- CV (ou RSD) - Coeficiente de variação ou Desvio padrão relativo
- DAD - Detector de arranjos de diodos
- DCM - Diclorometano
- DESI - Ionização por *electrospray* de dessorção
- DI-SDME - Microextração de gota suspensa por Infusão Direta
- DLLME - Microextração líquido-líquido dispersiva
- DP ou SD - Desvio padrão
- DPX - Extração em ponteira descartável
- d-SPE - Extração em fase sólida dispersiva
- EFSA - Autoridade Europeia para Segurança de Alimentos
- ELL ou LLE - Extração líquido-líquido
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- ESI(-) - Ionização por *electrospray* no modo negativo
- ESI(+) - Ionização por *electrospray* no modo positivo
- ESI-MS - Espectrometria de massas de ionização por *electrospray*

EVZ-UFG - Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás

FA - Fase Aquosa

FAO - Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

FAO/WHO - Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação e a Organização Mundial da Saúde

FDA - Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos

FLD - Detecção por fluorescência

FO - Fase orgânica

FP - Fase precipitada

FT-IR - Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier

GC - Cromatografia Gasosa

GC-LRMS - Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas de baixa resolução

GC-MS/MS - Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas tandem

HCA - Análise hierárquica de cluster

HF-LPME - Microextração em fase líquida por fibra oca

HPLC-DAD - Cromatografia líquida com detecção por arranjos de fotodiodos

HS-SDME - Microextração de gota suspensa por *Headspace*

IN - Instrução Normativa

LC - Cromatografia Líquida

LC-MS - Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas

LC-MS/MS - Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas *tandem*

LCQ - Espectrômetro de massas do tipo *ion trap*

LC-QqQ - Cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas do tipo Triplo Quadrupolo

LC-UV - Cromatografia líquida com detector ultravioleta

LME ou SML - Limite de migração específico

LMR - Limite Máximo de Resíduos

LOD - Limite de detecção

LOQ - Limite de quantificação

LPME - Microextração em fase líquida

m/z - razão massa/carga

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MeOH - Metanol

MEPS - Microextração em sorvente empacotado

MIP - Polímero molecularmente impresso

MISPE - Extração em fase sólida com polímero molecularmente impresso

MS - Espectrometria de massas

MS/MS - Espectrometria de massas *tandem*

MSPD - Dispersão de matriz em fase sólida

NQ - Não quantificado

OMS - Organização Mundial da Saúde

orthoPLS-DA ou oPLS-DA - Variação da técnica PLS-DA (ortogonalidade)

P.A.- Para análise

PAMVet - Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos

PC1 - Componente principal 1

PC2 - Componente principal 2

PC3 - Componente principal 3

PCA - Análise de componentes principais

PCs - Componentes principais

PEBD - Polietileno de baixa densidade

PET - Polietileno tereftalato

pH - Potencial Hidrogeniônico

pKa - logaritmo negativo da constante de acidez (K_a)

PLS - Mínimos quadrados parciais

PLS-DA - Análise discriminante de mínimos quadrados parciais

PLSR - Regressão dos Mínimos quadrados parciais

PNCRC - Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes

PNN - Rede neural probabilística

PSI-MS - Espectrometria de massas de ionização por *paper spray*

Q1 - Quadrupolo 1

Q2 - Quadrupolo 2

Q3 - Quadrupolo 3

Q-TOF - Quadrupolo no tempo de voo

QuEChERS - Método de extração em fase sólida dispersiva (d-SPE) usada para preparo de amostras. *QuEChERS* significa rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro

RAM-BSA - Fase Material de Acesso Restrito - Albumina Sérica Bovina

RDC - Resolução da Diretoria Colegiada

RP-LC-DAD - Cromatografia líquida de fase reversa com detector de arranjo de diodos

RSD - Desvio padrão relativo

SBSE - Extração sortiva em barra de agitação

SDME - Microextração de gota suspensa

SERS - Espectroscopia Raman com amplificação de superfície

SPE - Extração em fase sólida

sPLS-DA - Variação da técnica PLS-DA (esparsidade)

SPME - Microextração em fase sólida

SRM - Monitoramento de reações selecionadas

SVM - Máquina de suporte de vetores

TOF - Espectrômetro de massas do tipo Tempo de voo

TQMS - Analisador do Tipo Triplo Quadrupolo

UE - União Europeia

UHT - Leite que foi processado em temperatura ultra-alta

UPLC-MS/MS - Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas tandem

UPLC-TOF-MS - Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrômetro de massas do tipo TOF

USDA - Departamento de Agricultura dos Estados Unidos

Sumário

Capítulo I: Determinação de ceftiofur em leite bovino por LC-MS/MS

INTRODUÇÃO	25
1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	31
1.1 - Importância do leite na dieta humana: Leite bovino, produção, e importância econômica	31
1.2 - Ceftiofur	32
1.3 - Preparo de amostra de leite para a análise de resíduos de antibióticos	34
1.4 - Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em Tandem (LC-MS/MS)	35
2. - OBJETIVOS	38
2.1 - Objetivo Geral	38
2.2 – Objetivos Específicos	38
3 - METODOLOGIA	39
3.1 – Padrões e Reagentes Analíticos	39
3.2 – Análise por PSI-MS	39
3.2.1 – Parâmetros instrumentais para análise direta em PSI-MS	39
3.2.2 – Testes com papéis não modificados e modificados	39
3.3 – Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas	39
3.4 – Análise do teor de CFT em amostras de leite bovino	40
3.4.1 – Coleta das amostras de leite	40
3.4.2 – Preparo das amostras de leite bovino – Testes preliminares	41
3.5 – Performance Analítica	49
3.6 – Análise de CFT em amostras reais de leite bovino	50
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1 – Análise de CFT em leite bovino via PSI-MS	51

4.2 – Aspectos gerais do CFT em LC-MS/MS.....	52
4.3 – Testando metodologias de extração e <i>clean-up</i> do leite bovino	54
4.3.1 – Extração 1 – Extração com ACN acidificada e <i>clean-up</i> em SPE C18	55
4.3.2 – Extração 2 – Extração com MeOH:H ₂ O e <i>clean-up</i> em SPE C18..	55
4.3.3 – Extração 3 – Extração com ACN e <i>clean-up</i> em SPE C18.....	56
4.3.4 – Extração 4 – Extração em ACN e <i>clean-up</i> em membrana de celulose	57
4.3.5 – Extração 5 – Extração em ACN e <i>clean-up</i> em DPX com fase RAM/BSA	57
4.3.6 – Extração 6 – Extração em ACN acidificada e <i>clean-up</i> em DPX com fase C18 e fase RAM/BSA	58
4.3.7 – Extração 7 – Extração em MeOH e <i>clean-up</i> em SPE C18.....	59
4.3.8 – Extração 8 – Extração em ACN e MeOH.....	59
4.3.9 – Extração 9 – Extração em MeOH:H ₂ O e <i>clean-up</i> em SPE C18	60
4.3.10 – Extração 10 - Extração em MeOH a baixa temperatura	61
4.3.11 – Extração 11 - Extração em MeOH a baixa temperatura e LLE.....	61
4.3.12 – Extração 12 - Extração em MeOH a baixa temperatura e LLE.....	62
4.3.13 – Extração 13 – Buscando o analito na LLE.....	63
4.4 – Performance Analítica para o leite fortificado	63
4.5 - Análise de CFT em amostras reais de leite bovino	66
5 - CONCLUSÃO.....	70

Capítulo II: Determinação de bisfenóis (A e S) em leite longa vida e suas respectivas embalagens por PSI-MS

1.- FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	72
1.1 – A importância das embalagens cartonadas no envase do leite bovino	73

1.2 – Interação embalagem com o alimento.....	74
1.3 - Análise direta em espectrometria de massas	75
2. OBJETIVOS	79
2.1 – Objetivo Geral.....	79
2.2 – Objetivos Específicos	79
3 - METODOLOGIA.....	79
3.1 – Materiais e Reagentes.....	79
3.2 – Amostras	79
3.3 - Aparato instrumental	80
3.4 – Otimização do PSI-MS	80
3.5 - Análise direta por <i>paper spray</i> (embalagem e leite)	80
3.6 - Determinação de BPA e BPS em amostras de leite.....	81
3.7 – Performance analítica.....	82
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	82
4.1 – Otimização do método PSI-MS.....	82
4.2 - Análise PSI-MS das embalagens de leite.....	84
4.3 - Determinação de BPA e BPS em amostras de leite	87
5 - CONCLUSÃO.....	94

Capítulo III: Desenvolvimento de método miniaturizado (HF-LPME) para extração de herbicidas em amostras de arroz por análise direta (ESI-MS)

1 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	97
1.1 – Produção de arroz no Brasil	97
1.2 – Agrotóxicos.....	97
1.3 – Técnicas miniaturizadas de preparo de amostras	99
2 - OBJETIVOS	103
2.1 – Objetivo Geral.....	103

2.2 – Objetivos Específicos	103
3 - METODOLOGIA.....	103
3.1 – Padrões e Reagentes Analíticos.....	103
3.2 – Materiais usados para HF-LPME.....	103
3.3 – Aparato instrumental.....	103
3.4 – Otimização do método HF-LPME	104
3.5 – Testes adicionais.....	106
3.6 – Novo Planejamento Fatorial para octanol e decanol	108
3.7 – Sistema trifásico utilizando decanol.....	109
3.8 – Sistema trifásico otimizado	110
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	110
4.1 - Parâmetros para análise de espectrometria de massas.....	110
4.2 - Linearidade.....	113
4.3 - Planejamento fatorial.....	114
4.4 - Teste Variação de Concentração no LMR.....	117
4.5 - Teste do pH e Força Iônica	117
4.6 - Sistema Trifásico	118
4.7 - Comparação entre os Testes	120
4.8 - Novo Planejamento Fatorial para octanol e decanol	121
4.9 - Sistema trifásico utilizando decanol.....	122
4.10 - Sistema trifásico otimizado	123
5 - Conclusão	124

Capítulo IV: Análise quimiométrica de amostras de arroz não contaminadas e contaminadas com fungicidas a partir da análise direta por espectrometria de massas em modos ESI(+) e ESI(-)

1 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	126
---------------------------------	-----

1.1 – Fungicidas e seu uso na produção de arroz	126
1.2 – Análise direta por espectrometria de massas de alta resolução em equipamento do tipo Q-TOF.....	127
1.3 – Análise quimiométrica e aplicação em espectrometria de massas..	129
1.3.1 – Ferramentas estatísticas multivariadas aplicadas na análise quimiométrica.....	130
1.3.2 – Representação dos dados em análise multivariada	132
1.3.3 - Normalização dos dados na análise quimiométrica.....	133
2 - OBJETIVOS	134
2.1 – Objetivo Geral.....	134
2.2 – Objetivos Específicos	134
3 - METODOLOGIA.....	134
3.1 – Materiais e Reagentes.....	134
3.2 – Amostras	134
3.2.1 – Preparo das amostras	135
3.3 – Aparato instrumental.....	135
3.4 – Infusão direta via ESI-MS	136
3.5 – Análise quimiométrica e tratamento de dados	136
5 - Conclusão	153
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	155
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	157

RESUMO

O presente estudo traz abordagens da cromatografia líquida e espectrometria de massas como ferramentas para identificação e quantificação de contaminantes em alimentos, como arroz e leite bovino. Para fins de entendimento, este estudo está dividido em quatro etapas: 1) Desenvolvimento de metodologia LC-MS para quantificação do antibiótico ceftiofur em amostras de leite bovino; 2) Determinação de bisfenóis (A e S) em leite longa vida e em suas respectivas embalagens por *Paper Spray Ionization* (PSI-MS); 3) Desenvolvimento de metodologia para determinação de herbicidas em amostras de arroz (*Oryza sativa*) empregando a técnica miniaturizada de preparo de amostra microextração em fase líquida por fibra oca (HF-LPME) com análise por *electrospray ionization* (ESI-MS); 4) Análise quimiométrica comparando amostras de arroz contaminadas com fungicidas e não contaminadas a partir da análise direta por ESI-MS. Na etapa 1, para determinação de ceftiofur em amostras de leite foi desenvolvida um método de extração líquido-líquido (ELL) seguido da análise dos extratos por LC-MS. As principais variáveis associadas ao processo de extração foram otimizadas e as figuras de mérito: linearidade, limite de detecção e quantificação (LOD e LOQ), precisão e recuperação foram avaliadas. O método apresentou LOQ $0,80 \text{ ng.mL}^{-1}$, precisão inter-dia inferior a 7,3% e recuperação superior a 94%. Foram analisadas amostras de leite obtidas de vacas submetidas à aplicação do antibiótico para fins de avaliação do perfil de eliminação do antibiótico nas amostras de leite. Na parte 2, foi possível desenvolver um método rápido para análise de bisfenóis (BPA e BPS) em amostras de leite longa vida e suas respectivas embalagens empregando espectrometria de massas ambiente através da técnica PSI-MS. O método foi otimizado e teve as figuras de mérito linearidade, precisão, exatidão, LOQ e LOD avaliadas, estando todas dentro dos parâmetros exigidos pela legislação nacional. Os bisfenóis em estudo foram detectados em todas as amostras (de embalagens e leite) sendo que em apenas uma amostra o teor de BPA foi acima de 10 ng.mL^{-1} (limite máximo de resíduo) e para BPS a maioria das amostras apresentaram teores acima da mesma concentração. No leite, foi obtido um teor de até 150 ng.mL^{-1} para BPA e um teor médio de 60 ng.mL^{-1} para BPS. Os resultados deste estudo foram publicados no periódico *Food Chemistry* (qualis A1). No capítulo 3, é apresentado o uso da técnica miniaturizada de preparo de amostras HF-LPME

seguida da análise por espectrometria de massas de ionização ESI para uma determinação de herbicidas em arroz. Os principais parâmetros relativos ao método de preparo de amostras foram otimizados sendo que com o uso de sistema bifásico resultou em menores tempos de extração. Entretanto, em sistema trifásico, com a fase doadora em pH 1,7 e a fase aceptora em pH 12, a extração foi favorecida para todos os analitos. A força iônica foi avaliada pela adição de sal a solução doadora e não favoreceu a extração. Desta forma, o sistema trifásico apresentou melhor resposta para os analitos e o método deverá ter as figuras de mérito avaliadas empregando o método HF-LPME/ESI-MS otimizado. O quarto capítulo apresenta uma análise metabolômica seguida de tratamento quimiométrico de dados obtidos pela análise ESI-MS em amostras de extratos de arroz empregando os modos positivos e negativos. Foi realizada uma comparação de amostras em 4 matrizes distintas (casca do arroz, grão com casca, grão polido sem casca e grão não polido sem casca). As amostras avaliadas foram divididas em dois grupos: contaminadas com fungicidas e não contaminadas. Os dados obtidos possibilitaram a separação em classes empregando os tratamentos por análises de componentes principais (PCA). No modo ESI(-), os dados foram melhores explicados pela PCA Sem normalização (89,1%) e também pela Normalização pelo quantil (90%). O modo negativo explica melhor a dissimilaridade entre os grupos de arroz contaminado e não contaminado.

Palavras-chave: leite, arroz, cromatografia líquida, espectrometria de massas.

ABSTRACT

The present study uses liquid chromatography and mass spectrometry approaches as tools for identifying and quantifying contaminants in foods, such as rice and bovine milk. For the sake of comprehension, this study is divided into four stages: 1) Development of an LC-MS methodology for quantifying the antibiotic ceftiofur in bovine milk samples; 2) Determination of bisphenols (A and S) in long-life milk and its respective packaging by Paper Spray Ionization (PSI-MS); 3) Development of a methodology for determining herbicides in rice (*Oryza sativa*) samples using the miniaturized hollow fiber liquid phase microextraction sample preparation technique (HF-LPME) with electrospray ionization analysis (ESI-MS); 4) Chemometric analysis comparing rice samples contaminated with fungicides and not contaminated from direct analysis by ESI-MS. In step 1, to determine ceftiofur in milk samples, a liquid-liquid extraction (ELL) method was developed followed by analysis of the extracts by LC-MS. The main variables associated with the extraction process were optimized and the figures of merit: linearity, limit of detection and quantification (LOD and LOQ), precision and recovery were evaluated. The method presented LOQ 0.80 ng.mL^{-1} , inter-day precision of less than 7.3% and recovery greater than 94%. Milk samples obtained from cows subjected to antibiotic application were analyzed for the purpose of evaluating the antibiotic elimination profile in the milk samples. In part 2, it was possible to develop a rapid method for analyzing bisphenols (BPA and BPS) in long-life milk samples and their respective packaging using ambient mass spectrometry using the PSI-MS technique. The method was optimized and the figures of merit linearity, precision, accuracy, LOQ and LOD were evaluated, all of which were within the parameters required by national legislation. The bisphenols under study were detected in all samples (packaging and milk) and in only one sample the BPA content was above 10 ng.mL^{-1} (maximum residue limit) and for BPS the majority of samples presented levels above the same concentration. In milk, a content of up to 150 ng.mL^{-1} for BPA and an average content of 60 ng.mL^{-1} for BPS was obtained. The results of this study were published in the journal Food Chemistry (qualis A1). In chapter 3, the use of the miniaturized HF-LPME sample preparation technique followed by ESI ionization mass spectrometry analysis for the determination of herbicides in rice is presented. The main parameters relating to the sample preparation method were optimized, with the use of a two-phase system resulting in shorter extraction times.

However, in a three-phase system, with the donor phase at pH 1.7 and the acceptor phase at pH 12, extraction was favored for all analytes. The ionic strength was evaluated by adding salt to the donor solution and did not favor extraction. Therefore, the three-phase system presented a better response to the analytes and the method should have its figures of merit evaluated using the optimized HF-LPME/ESI-MS method. The fourth chapter presents a metabolomic analysis followed by chemometric treatment of data obtained by ESI-MS analysis on rice extract samples using positive and negative modes. A comparison of samples was carried out in 4 different matrices (rice husk, grain with husk, polished grain without husk and unpolished grain without husk). The samples evaluated were divided into two groups: contaminated with fungicides and not contaminated. The data obtained made it possible to separate them into classes using treatments using principal component analysis (PCA). In ESI(-) mode, the data were better explained by PCA Without normalization (89.1%) and also by Quantile Normalization (90%). The negative mode better explains the dissimilarity between the contaminated and uncontaminated rice groups.

Keywords: milk, rice, liquid chromatography, mass spectrometry.

INTRODUÇÃO

A Segurança Alimentar representa a disponibilidade e acesso aos alimentos, ou seja, o direito à alimentação. Mas, para que ela seja contemplada, é necessário que o alimento seja produzido de maneira segura e por isso a Segurança de Alimentos representa a garantia da qualidade do produto que é disponibilizado ao consumidor. Para garantir essa qualidade, é necessária a contribuição de toda cadeia produtiva de alimentos desde a matéria-prima até a disponibilidade do produto para consumo (FAO; IFAD; UNICEF; WFP; WHO, 2023). Ao longo dos anos, inúmeros esforços vêm sendo realizados por diferentes organizações mundiais a fim de garantir a segurança alimentar. Dentre esses, destacam-se as ações da Organização das Nações Unidas compiladas na Agenda 2030 (UNITED-NATIONS, 2015).

A Agenda 2030 é um plano de ação para as pessoas, para o planeta e para a prosperidade. O documento foi definido em setembro de 2015 numa Assembleia Geral das Nações Unidas, em Nova York, e busca fortalecer a paz mundial e reconhece que a erradicação da pobreza é o maior desafio global e requisito indispensável para o desenvolvimento sustentável. No contexto da Agenda 2030 a segurança alimentar é um dos objetivos de desenvolvimento sustentável, especificamente o objetivo 2 deste documento que apresenta a proposta de acabar com a fome, alcançar a segurança alimentar e melhoria da nutrição e promover a agricultura sustentável. Para alcançar esse objetivo, várias metas e indicadores foram estabelecidos: erradicar a fome, alcançar a segurança alimentar, melhorar a nutrição, promover a agricultura sustentável e garantir sistemas alimentares sustentáveis (UNITED-NATIONS, 2015).

Os contaminantes em alimentos variam de acordo com o alimento, sua origem, processamento e preparo. Os micro-organismos patogênicos, como por exemplo, *Salmonella* e *E. coli*, podem causar doenças transmitidas por alimentos quando esses micro-organismos estão presentes em quantidade suficiente (LEMOS et al., 2020). Os resíduos de pesticidas utilizados durante o cultivo podem estar presentes em alimentos de origem vegetal. Os contaminantes químicos incluem os metais pesados (mercúrio em peixes), produtos químicos industriais (dioxinas, bisfenóis e outros poluentes orgânicos persistentes), aditivos alimentares não seguros (corantes, conservadores, etc) (MANSOUR, 2011). As micotoxinas são compostos produzidos pelo metabolismo de fungos e que causam danos devido sua ingestão, como por exemplo aflatoxinas em grãos como amendoim e milho) (NESCI et al., 2016). Os resíduos de medicamentos veterinários podem ser encontrados em alimentos de origem animal como carne e laticínios (antibióticos em carne bovina e de frango, leite) (SU et al.,

2018). Os poluentes ambientais podem afetar alimentos de origem marinha (bifenilas policloradas e metais pesados) (HUANG et al., 2020).

A detecção de contaminantes em alimentos é fundamental para garantir a segurança alimentar e a qualidade do produto que será consumido. Existem diversas técnicas disponíveis para identificação desses compostos nos alimentos. A escolha da técnica depende do tipo de substância a ser detectada. Dentre as técnicas analíticas disponíveis para tal finalidade, as técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas apresentam-se como a mais comuns e com o melhor desempenho (DI STEFANO et al., 2012).

O acoplamento de um cromatógrafo com o espectrômetro de massas combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas (obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento da seletividade) (TOLENTINO JÚNIOR et al., 2021). O acoplamento é possível quando cada instrumento não apresente interferência pela sua conexão, não devem ocorrer modificações químicas não controladas do analito e ainda a perda de amostra da passagem de um equipamento para outro (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

Os tipos mais comuns de cromatografia utilizadas acopladas a espectrometria de massas são a cromatografia gasosa (GC) e a cromatografia líquida (LC). A combinação com outras técnicas de separação, como a eletroforese capilar, a cromatografia em camada delgada e a cromatografia de permeação em gel são usadas com menor frequência (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

O controle de contaminantes em alimentos é uma preocupação global e muitos países e organizações tem normas e regulamentos rigorosos para garantir a segurança alimentar (YUN LI; SHI, 2022). As principais normas vigentes para o controle de contaminantes em alimentos são: *Codex Alimentarius* que representa uma coleção de padrões de alimentos, diretrizes e códigos de práticas desenvolvidas pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e alimentação (FAO) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) (FAO; IFAD; UNICEF; WFP; WHO, 2023). Regulamentações da União Europeia que apresentam rigorosas legislações de segurança alimentar através da Autoridade Europeia para a Segurança de Alimentos (EFSA, [s.d.]); Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (FDA) estabelece regulamentos rigorosos sobre resíduos de pesticidas, contaminantes químicos e aditivos alimentares (FDA, [s.d.]). No Brasil, as principais normas e regulamentos para o controle de contaminantes em alimentos são estabelecidas pela Agência Nacional de

Vigilância Sanitária (ANVISA) e pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). As principais regulamentações relacionadas ao controle de contaminantes de alimentos no Brasil são: a RDC 12/2001 que dispõe sobre os padrões microbiológicos para alimentos; a RDC 4/2012 que define os limites máximos de resíduos de pesticidas em alimentos; a IN 211/2013 que estabelece a lista de aditivos alimentares autorizados e as condições de uso permitidas em alimentos; a RDC 42/2013 que regulamenta a presença de metais pesados em alimentos; a RDC 7/2011 que estabelece os limites máximos de micotoxinas em alimentos e a RDC 53/2012 que dispõe sobre os limites máximos permitidos para resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal.

Desta forma, é importante desenvolver métodos analíticos robustos, precisos e sensíveis na determinação de contaminantes em alimentos sabendo que o leite e o arroz representam matrizes complexas e necessitam de um adequado preparo de amostras para um bom desempenho dos métodos de análise (JUNZA et al., 2014). A cromatografia líquida (LC) e a espectrometria de massas (MS) são as técnicas analíticas mais utilizadas para detecção e quantificação de resíduos, devido a sua alta sensibilidade e seletividade (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008). No entanto, estas técnicas necessitam de um rigoroso preparo de amostras para que os analitos de interesse, geralmente presentes em baixas concentrações, possam ser determinados com a confiabilidade desejada, pois uma das principais desvantagens destas técnicas é com relação a suscetibilidade de variações decorrentes dos sinais dos componentes da matriz. Apesar de serem técnicas poderosas para identificar e quantificar compostos em amostras de alimentos, existem problemas comuns associados a esse tipo de matriz que pode ser o entupimento do sistema cromatográfico, a coeluição (quando dois ou mais compostos eluem da coluna cromatográfica e são detectados como um único pico) e a supressão de sinal que ocorre quando a presença dos componentes da matriz interfere na ionização ou detecção dos analitos levando à redução da intensidade do sinal analítico (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008b).

O leite e os produtos lácteos representam alimentos mais consumidos em todo o mundo e são importantes na dieta da população. O Brasil ocupa o terceiro lugar na produção mundial de leite. Em 2018 a produção foi de 33,840 bilhões de litros sendo o Sul e Sudeste, as regiões de maior destaque. O Centro-Oeste ocupa o quarto lugar contribuindo com uma produção de 4,108 bilhões de litros neste mesmo ano. De acordo com *Our World in Data*, os últimos dados

da produção global de leite é de 2021, e indicam um valor médio de 116,09 kg *per capita*. (RITCHIE; ROSADO; ROSER, 2023).

O arroz (*Oryza sativa* L.) é a cultura alimentar mais difundida globalmente, sustentando a alimentação de mais de metade da população mundial e servindo como a principal fonte de renda para a maioria das pessoas na Ásia e na África. O Brasil se encontra entre os maiores produtores de arroz do mundo e é classificado como principal produtor da América Latina, com uma produção anual de 10 milhões de toneladas. De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), o Brasil produziu cerca 7,48 milhões de toneladas a na safra de 2020/2021 (MOHIDEM et al., 2022). Dados da safra 2021/2022 indicam a produção de 10,803 milhões de toneladas do produto. Sendo 90% destinado ao consumo interno e 10% destinados à exportação (CONAB, 2023).

Diante da notabilidade desses alimentos na cadeia produtiva mundial e do país, bem como da importância em garantir alimentos livres de contaminantes para a população, nesse trabalho são apresentadas diferentes abordagens para avaliar diferentes contaminantes, como antibiótico, herbicidas e bisfenóis nessas matrizes. Os resultados são reportados em quatro capítulos que são resumidos a seguir.

No capítulo 1 são apresentadas metodologias de extração de antibiótico, especificamente o ceftiofur, em amostras de leite bovino para determinação da concentração deste analito por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas tandem (LC-MS/MS). Dentre elas foram testadas: extração em fase sólida (SPE), extração em ponteira descartável (DPX) e extração líquido-líquido (LLE). Além disso, também são apresentados resultados por *Paper Spray Ionization* (PSI-MS).

O capítulo 2 reporta um estudo sobre a presença de Bisfenol A e S em amostras de leite longa vida e suas embalagens cartonadas comercializadas no mercado brasileiro. A presença e as devidas concentrações dos contaminantes nas embalagens em diferentes marcas de leite foram determinadas utilizando a técnica de Espectrometria de Massas Ambiente PSI-MS.

No capítulo 3, apresenta-se o uso da microextração em fase líquida suportada com fibra oca (HF-LPME) para a análise de herbicidas e sua detecção por meio da espectrometria de massas (MS) em modo de ionização *Electrospray* positivo (ESI+). O objetivo geral foi avaliar a eficiência de extração dos herbicidas (imazapic, imazapir e clomazone) por HF-LPME selecionando os melhores parâmetros para a técnica de extração.

O capítulo 4 compreende um estudo quimiométrico de amostras de arroz contaminadas com fungicidas a partir da análise direta por espectrometria de massas. Foram avaliados quatro tipos de matrizes diferentes (arroz com casca, arroz sem casca polido, arroz sem casca não polido e a casca do arroz) em amostras contaminadas e não contaminadas.

Em resumo, este trabalho consiste em desenvolvimento de metodologias utilizando a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas para a determinação de contaminantes em matrizes alimentares, como o leite bovino. E ainda, avaliação de técnicas de espectrometria de massas ambiente e por infusão direta como ferramenta analítica para a determinação de contaminantes em alimento comercial (leite UHT) e arroz *in natura*.

Capítulo I:
Determinação de ceftiofur em leite bovino por LC-
MS/MS

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 - Importância do leite na dieta humana: Leite bovino, produção, e importância econômica

O leite bovino é um dos alimentos mais importantes na dieta humana, pois este alimento e seus derivados apresentam grande valor nutricional, sendo fonte de minerais, proteínas e vitaminas (JADHAV et al., 2019). Como fonte de minerais, disponibiliza o cálcio, fósforo e magnésio, que são essenciais para o desenvolvimento saudável dos ossos. O consumo adequado de substâncias presentes no leite pode ajudar a tornar os ossos mais fortes, prevenindo doenças como a osteoporose (TUCKER, 2009).

O Brasil é um dos principais produtores de leite bovino em todo o mundo. (MARTINS-JÚNIOR et al., 2007). Nas últimas décadas, a produção leiteira brasileira evoluiu de forma contínua, resultando no crescimento consistente da produção, que colocou o Brasil como um dos principais produtores mundiais. Em 2020, foram produzidos aproximadamente 25,6 bilhões de litros no país (2,5 bilhões de litros produzidos em Goiás). Em 2021, devido aos efeitos da pandemia de covid-19, houve uma queda na produção e o Brasil produziu um valor de aproximadamente 25,1 bilhões de litro (2,4 bilhões de litros em Goiás) (EMBRAPA, 2022).

Uma das principais causas da perda de produção e qualidade do leite é a presença de infecções bacterianas nas mamas das vacas leiteiras, conhecida como mastite bovina. (PINZÓN-SÁNCHEZ; RUEGG, 2011). A prevenção e o tratamento desta doença são realizados pela administração de antibióticos no animal. Quando as concentrações destes fármacos ultrapassam o Limite Máximo de Resíduos (LMR), a qualidade do leite pode ser comprometida e apresentar riscos à saúde humana (JADHAV et al., 2019). O ceftiofur (CFT) é um dos antibióticos mais utilizados no tratamento da mastite bovina (CRISTINA et al., 2010).

Os medicamentos veterinários são regulados pelo Limite Máximo de Resíduos (LMR) que representa a quantidade máxima de resíduos permitida legalmente em alimentos. A Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação e a Organização Mundial da Saúde (FAO/WHO) determina os LMR de contaminantes em alimentos em todo o mundo através do *Codex Alimentarius* (MASIÁ et al., 2016). No Brasil, este limite está estabelecido no Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) sob coordenação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e também sob o escopo do Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos (PAMVet), da

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que analisa leite UHT, leite em pó e leite pasteurizado (PACHECO-SILVA; DE SOUZA; CALDAS, 2014).

Quando a concentração de determinado fármaco, mais especificamente os antibióticos, está acima do LMR a qualidade do leite pode ser comprometida e apresentar riscos a curto e/ou longo prazo para a saúde humana, o que inclui: reações alérgicas, toxicológicas e aumento da resistência antimicrobiana (JADHAV et al., 2019). Sendo assim, é importante desenvolver métodos analíticos robustos, precisos e sensíveis para a determinação de contaminantes em alimentos.

A resistência a antibióticos é um grave problema de saúde pública. A exposição contínua a estes compostos pode levar a resistência dos micro-organismos e as infecções causadas por bactérias resistentes podem ser difíceis de curar. A existência de bactérias resistentes a antibióticos tem sido relatada desde a década de 90 e isto levou ao desenvolvimento de novas gerações de antibióticos nas últimas décadas (BAEZA et al., 2016; JANK et al., 2015). Este é um outro motivo pelo qual torna-se imprescindível o controle das concentrações de resíduos de antibióticos em leite.

1.2 - Ceftiofur

O ceftiofur (CFT) é um antibiótico semi-sintético, do grupo das cefalosporinas (antibióticos β -lactâmicos) de terceira geração que tem aplicação significativa na clínica veterinária devido ao seu amplo espectro de atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, e alta eficiência no tratamento de infecções respiratórias, urinárias, dermatológicas e doenças infecciosas (RIBEIRO; LUTZE; SCHMIDT, 2018). Esse antibiótico é utilizado no gado leiteiro e de corte, suínos, equinos e pintinhos (ZHANG et al., 2017). A Figura 1 apresenta a estrutura da molécula do CFT. A Tabela 1 apresenta algumas propriedades físico-químicas desse antibiótico.

O CFT atua na fragilização da parede das bactérias, permitindo uma maior penetração de água. Com isso, promove a ruptura da parede celular acarretando a sua destruição. Possui baixa carência, ou seja, rápida liberação pelo organismo, alguns pesquisadores atribuem ao tamanho da estrutura molecular, outros pela baixa afinidade ao tecido mamário. Porém, a literatura relata que a molécula é tempo-dependente, ou seja, mantém-se circulante em altas concentrações durante vários dias (CRISTINA et al., 2010; RIBEIRO; LUTZE; SCHMIDT, 2018).

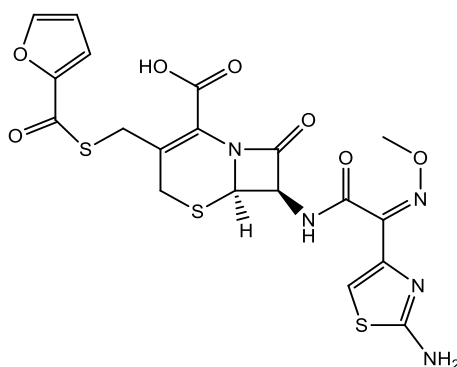


Figura 1. Estrutura química do antibiótico Ceftiofur.

Tabela 1. Informações físico-químicas do Ceftiofur.

Fórmula Molecular	C ₁₉ H ₁₇ N ₅ O ₇ S ₃
Massa Exata	523,029011 g.mol ⁻¹
Massa Monoisotópica	523,029011 g.mol ⁻¹
Nomenclatura IUPAC	(6R,7R)-7-[[[(2Z)-2-(2-amino-1,3-tiazol-4-il)-2-metoxi-imino acetil] amino]-3-(furan-2-carbonilsulfanilmetil)-8-ácido-oxo-5-tia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-eno-2-carboxílico
Fsp ^{3(a)}	0,26
Doador de ligação de H	3
Aceptor de ligação de H	9
Polarizabilidade ^(b)	47,04 Å ³
Refratividade Molar ^(c)	124,51 cm ³ /mol
pKa ácido mais forte	2,52
logP ^(d)	0,111
Solubilidade em água	23 mg,L ⁻¹ (a 25°C)
Pressão de vapor	5,9.10 ⁻²⁰ mmHg

^(a)A fração de átomos de Csp³ para determinar a saturação de C das moléculas e caracterizar a complexidade da estrutura espacial das moléculas. O aumento da saturação medida por Fsp³ e o número de centros quirais da molécula aumentam a taxa de sucesso clínico (pode estar relacionado ao aumento da solubilidade).

^(b)Mede a facilidade de distorção da nuvem eletrônica da molécula quando um campo elétrico (externo) é aplicado. Está relacionada ao volume ou tamanho da molécula (quanto maior a molécula, maior será sua polarizabilidade).

^(c)Está diretamente ligada à polarizabilidade. Depende da natureza da substância e do comprimento de onda.

^(d)Valor do coeficiente de partição. Utiliza-se um sistema de dois solventes (geralmente, octanol-água) para indicar a tendência do soluto em se distribuir na fase orgânica ou aquosa. Se logP=0 então P=1 (soluto tem a mesma afinidade por ambas as fases). Se logP<0 então P<1 (soluto se distribui preferencialmente na fase aquosa) e se logP>0 então P>1 (soluto tem mais afinidade pela fase orgânica). Quanto maior o logP, mais hidrofóbico é o composto.

1.3 - Preparo de amostra de leite para a análise de resíduos de antibióticos

Devido à complexidade da matriz do leite e produtos lácteos, a análise em nível traço (ng.mL^{-1} ou $\mu\text{g.kg}^{-1}$), apresentam-se como um desafio analítico (JUNZA et al., 2014). Neste aspecto, o preparo de amostras para esse tipo de matriz é essencial para o bom desempenho dos métodos. Em termos gerais, na determinação de resíduos de antibióticos em amostras de leite, os analitos se encontram em concentrações muito baixas e apresentam propriedades químicas distintas além disso, possuem alguns interferentes como: água, gordura, proteínas, lactose, sais minerais, vitaminas e enzimas, o que faz com que uma etapa prévia de preparo da amostra seja frequentemente realizada. (CHENG et al., 2021), (RAGEH et al., 2019). Os interferentes no leite são assim chamados no método pois podem afetar a detecção dos analitos e influenciar nos resultados obtidos.

Os principais objetivos do preparo de amostra são: promover a extração e o enriquecimento dos analitos de interesse e a remoção, tanto quanto possível, dos interferentes. As perdas de analito nessa etapa podem comprometer o resultado das análises. Nesse aspecto, o preparo de amostra é uma etapa extremamente importante dentro de todo o processo analítico (LUIZ; MACIEL; LANÇAS, 2015).

Os métodos de extração e limpeza (*clean-up*) de amostras de alimentos são extremamente importantes para a determinação quantitativa nas matrizes de interesse (LANÇAS, 2008). Sendo assim, várias técnicas são utilizadas para essa finalidade, dentre elas destacam-se a extração líquido-líquido (*Liquid-liquid Extraction*, LLE), extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction*, SPE) e extração em ponteira descartável (*Disposable Pipette Extraction*, DPX).

A LLE (ou extração por solvente) é baseada na partição do analito entre duas fases imiscíveis (orgânica e aquosa). O agente extrator selecionado deve ter afinidade pelo analito, a fim de aumentar a seletividade da extração. A LLE é amplamente utilizada em química analítica para separação e pré-concentração de compostos em matrizes complexas, como alimentos, água e amostras biológicas (LANÇAS, 2008; SKOOG et al., 2009).

Na década de 1940 a SPE teve sua primeira aplicação e foi introduzida no preparo de amostras em meados dos anos 1970 (LIŠKA, 2000). Nesta técnica, os analitos presentes na matriz aquosa são retidos após passarem por um cartucho contendo um material sorvente e, na sequência, um solvente orgânico é utilizado na eluição dos analitos (CALDAS et al., 2011). A SPE é uma técnica que apresenta algumas vantagens (maior sensibilidade e praticidade)

em relação a métodos de extração mais tradicionais. Mas também apresenta limitações, a dessorção dos analitos no cartucho requer o uso de solventes muitas vezes tóxicos (BARRIONUEVO; LANÇAS, 2001).

Uma técnica variante da SPE é a DPX, a qual é baseada no equilíbrio de sorção do analito presente na amostra com o sorvente. A DPX utiliza uma ponteira convencional de micropipeta em que o sorvente está contido livremente entre dois filtros. A extração ocorre em fase sólida dispersiva, já que a amostra é aspirada pela ponteira e misturada com o sorvente por meio da aspiração de ar. Quando comparada a SPE tradicional, a técnica apresenta as seguintes vantagens: é rápida e simples, pois minimiza as etapas de condicionamento, utilização reduzida de volume de amostra e também de solvente orgânico (PINTO; QUEIROZ, 2015). A Figura 2 apresenta uma representação de um dispositivo de DPX.

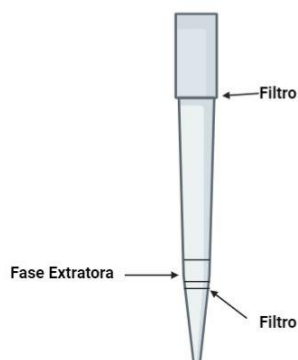


Figura 2. Esquema de uma ponteira DPX (PINTO; QUEIROZ, 2015).

1.4 - Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em Tandem (LC-MS/MS)

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em Tandem (LC-MS/MS) é a técnica analítica mais utilizada para detecção e quantificação de resíduos em amostras de alimentos, devido a sua alta sensibilidade e seletividade (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008) apresentando limite de quantificação (LOQ) na ordem de ng.mL^{-1} (ou $\mu\text{g.kg}^{-1}$) para a maioria dos compostos (PACHECO-SILVA; DE SOUZA; CALDAS, 2014). A

cromatografia líquida depende de bombas para passar um solvente líquido pressurizado contendo a mistura de amostra através de uma coluna preenchida com um material adsorvente sólido. Cada componente da amostra interage de maneira ligeiramente diferente com o material adsorvente da coluna, causando taxas de fluxo diferentes para os diferentes

componentes e levando à separação dos componentes conforme eles fluem para fora da coluna (LANÇAS, 2016).

A espectrometria de massas é uma técnica analítica que possibilita identificar, quantificar qualquer componente ionizável e determinar suas massas molares (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008). A análise se dá pela geração ou transferência de íons de acordo com a relação massa carga (m/z) em um analisador (de campo elétrico ou magnético) seguida da detecção de íons (GROSS, 2011). A Figura 3 apresenta um esquema geral de um espectrômetro de massas. A espectrometria de massas tandem (MS/MS) é a técnica espectrométrica que usa dois estágios. Um para isolar o íon de interesse (MS^1) e o outro é usado para estabelecer uma relação entre esse íon isolado e os outros íons gerados a partir da sua fragmentação (MS^2). Esta técnica é amplamente utilizada na detecção de compostos presentes em baixas concentrações em matrizes complexas. Quando acoplada à cromatografia, possibilita o aumento na detectabilidade e reduz a interferência espectral de compostos presentes na matriz, além de ampliar a quantidade de informação que pode ser obtida (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008), tais como na investigação de resíduos de cloridrato de CFT no leite de vacas pós-parto após infusão intramamária na secagem (KANG et al., 2018), num método multiclasses na determinação de 17 quinolonas e 14 β -lactamas em leite cru usando microextração líquido-líquido dispersiva (JUNZA et al., 2014b), na análise de traços de herbicidas sulfonilureia em amostras de água por SPE (FENOLL et al., 2012).

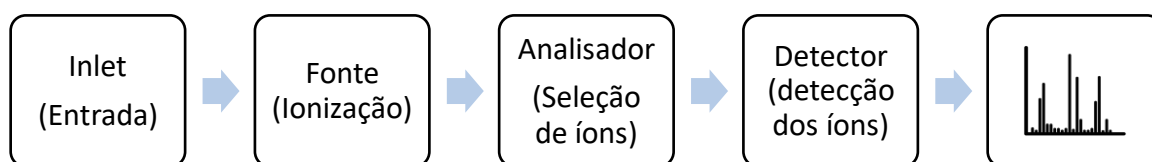


Figura 3. Esquema genérico das principais partes de um espectrômetro de massas.

Dentre as técnicas de ionização, a *electrospray ionization* (ESI) geralmente é empregada para analisar e acessar informações de compostos mais polares. A técnica é baseada na transferência de íons previamente formados em solução para a fase gasosa a partir de um campo elétrico. Os íons são ejetados da solução, na forma de um spray eletrolítico, no qual são dessolvatados e direcionados ao espectrômetro de massas (GROSS, 2011).

Dentre os tipos de analisadores disponíveis no mercado, o analisador do tipo Triplo Quadrupolo (TQMS) é amplamente utilizado para determinação de resíduos de antibiótico em

leite (MARTINS-JÚNIOR et al., 2007), na determinação de parabenos e bisfenóis em leite materno humano (DUALDE et al., 2019a), na análise multiresíduos de traços de pesticidas em solos (COLAZZO et al., 2018) e na análise de herbicidas e pesticidas em arroz polido (PAREJA et al., 2011b). O analisador é composto por três quadrupolos em série, no qual o segundo quadrupolo (Q2) não separa os íons de mesma m/z . O objetivo do Q2 é agir como cela de colisão na qual ocorre a fragmentação dos íons selecionados no primeiro quadrupolo (Q1) geralmente utilizando uma dissociação induzida por colisão (CID – *collision induced dissociation*) e estes íons são direcionados ao terceiro quadrupolo (Q3) (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008). A Figura 4 apresenta o esquema de um TQMS.

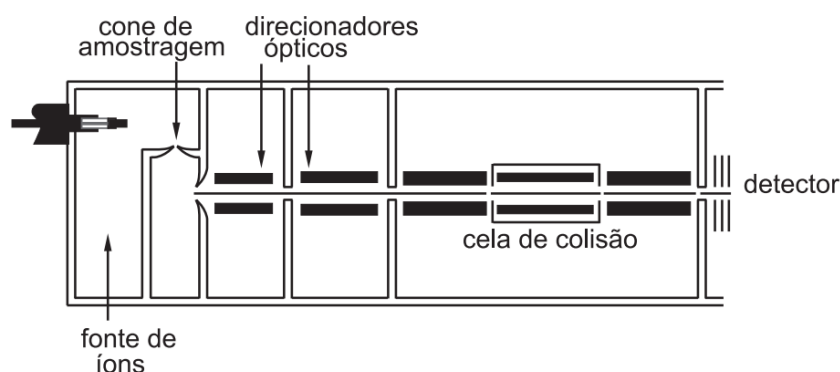


Figura 4. Esquema de um analisador do tipo triplo quadrupolo (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

Na CID, o íon precursor (em Q1) é acelerado por um potencial elétrico para uma região de alto vácuo (em Q2), onde sofre repetidas colisões com um gás inerte (geralmente N_2), ocasionando o aumento da energia potencial deste íon até a sua fragmentação, conduzindo a formação dos íons produto. Quando se utiliza uma baixa energia na CID, as reações de fragmentação conduzem a perda de fragmentos neutros (por exemplo, H_2O , $MeOH$, CO , CO_2 , etc) dependendo da estrutura do íon precursor. Quando se utiliza CID de alta energia, as informações geradas na fragmentação são mais significativas, pois geram a quebra das moléculas em posições específicas. Os fragmentos obtidos servem para elucidar o íon precursor. Ao se utilizar energias muito elevadas em CID podem ocorrer fragmentações descontroladas o que não contribui para elucidação dos compostos (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; GROSS, 2011).

Quando o analito se encontra na presença de outras moléculas de mesma massa molecular nominal, a CID pode melhorar a detectabilidade do método quando são gerados os

fragmentos. Todos os quadrapolos são controlados para transmitir íons de uma única razão m/z ou de um intervalo de razões m/z para gerar informação analítica mais exata (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; GROSS, 2011).

2. - OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral

Desenvolvimento de um método LC-MS/MS para determinação de CFT em amostras de leite bovino.

2.2 – Objetivos Específicos

Avaliar diferentes metodologias de preparo de amostra para a análise de CFT por LC-MS/MS.

Otimizar os principais parâmetros da técnica de preparo de amostras utilizada para determinação de CFT.

Otimizar o método LC-MS/MS para determinação de CFT em amostras de leite.

Avaliar a performance analítica da metodologia desenvolvida baseado nas figuras de mérito: linearidade, LOD, LOQ, exatidão, precisão e recuperação.

3 - METODOLOGIA

3.1 – Padrões e Reagentes Analíticos

Os solventes de grau HPLC Metanol (MeOH), Acetonitrila (ACN), e Hexano foram obtidos pela Tedia (Fairfield, Estados Unidos). O Papel cromatográfico Whatman #1 (poros de 11 μm) foi obtido da Whatman International Ltda (Maidstone, Inglaterra). O padrão analítico Ceftiofur (CFT), VETRANAL®, Merck (Darmstadt, Alemanha). Pirrol (98%) obtido pela Sigma-Aldrich (Barueri, Brasil). Ácido nítrico (65%), P.A., foi obtido da Hexis (Jundiaí, Brasil). Hipoclorito de sódio (10-12%), P.A., foi obtido da Dinâmica (São Paulo, Brasil). Cloreto férrico, P.A., foi obtido pela Synth (Diadema, Brasil). Ácido fórmico (grau LC-MS), foi obtido pela Sigma Aldrich (Barueri, Brasil).

3.2 – 3.2 – Análise por PSI-MS

3.2.1 – Parâmetros instrumentais para análise direta em PSI-MS

O papel cromatográfico cortado em formato triangular (1 cm de lado) foi preso a uma garra conectada a um fio ligado ao espectrômetro de massas *ion trap* LCQ (Thermo Fisher Scientific, Alemanha). As condições usadas no experimento foram: voltagem do spray: 3 kV, Temperatura do capilar: 275 °C, Voltagem do tube lens: 100 V, voltagem do capilar: 50 V, modo de leitura: positivo e faixa de massa: 100 a 1000.

3.2.2 – Testes com papéis não modificados e modificados

Foram realizados testes em papel modificado e não modificado. Os papéis modificados foram preparados da seguinte maneira:

Modificado 1 – solução de 0,1 mol L⁻¹ de pirrol em ACN com solução de 0,1 mol L⁻¹ de HNO₃. Foram adicionadas as soluções em placa de Petri separadas e o papel foi mergulhado cinco vezes em cada solução (para garantir o revestimento). O papel foi aquecido em estufa (50 °C) por 12 h.

Modificado 2 - solução de 0,1 mol L⁻¹ de pirrol em água com solução de 1% NaClO. Foram adicionadas as soluções em placa de Petri separadas e o papel foi mergulhado cinco vezes em cada solução (para garantir o revestimento). O papel foi seco em estufa (50 °C) por 12 h.

Modificado 3 – Em agitação constante durante 4 horas, solução de 0,001 mol L⁻¹ de pirrol e adicionou-se solução 0,1 mol L⁻¹ FeCl₃.2H₂O gota-a-gota. O produto foi adicionado a

uma placa de Petri e o papel foi colocado em contato com a mistura. Repouso por 24 horas. Foi retirada a parte aquosa e o material foi aquecido em estufa (50 °C) por 16 h.

Todos os papéis modificados foram lavados cinco vezes com MeOH e secos em estufa (50 °C) por 15 minutos. No LCQ foram testadas as soluções de CFT em leite bovino no papel sem modificação e no papel modificado na concentração de 1000 ng.mL⁻¹.

3.3 – Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas

Os equipamentos utilizados para a análise foram Cromatógrafo Líquido *Ultimate 3000*, *Thermo Scientific*, com coluna *C18* (150 x 4.6 mm, 5 µm) acoplado ao Espectrômetro de Massas *TSQ Quantum*, *Thermo Scientific*, com fonte H-ESI e operando em modo positivo, utilizando-se voltagem do spray de 3500 V, gás de bainha 65, gás auxiliar de 30, temperatura do capilar 320 °C. A análise por LC foi realizada em modo isocrático com solução aquosa (Fase móvel A) e acetonitrila (Fase móvel B), ambas acidificadas com 0,03% de ácido fórmico, na proporção de 70:30, com fluxo de 0,50 mL/min, volume injeção 20 µL e temperatura da coluna de 30 °C, resultando em um tempo de corrida de 20 minutos.

A otimização das condições de MS/MS, identificação do íon precursor e dos íons produtos e a seleção da energia de colisão (CE) (13, 15, 18 e 52 eV), mais favoráveis para a análise de CFT foram realizadas através da injeção de soluções individuais do padrão no espectrômetro de massas no modo positivo. As soluções de injeção foram obtidas por diluição da solução estoque até a concentração de 100 ng.mL⁻¹ em MeOH. O tratamento de dados foi executado através do software Thermo Xcalibur 2.2.

As análises LC-MS/MS foram realizadas no Centro Regional para o Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (CRTI) da Universidade Federal de Goiás com apoio da Profa. Dra. Cecília Maria Alves de Oliveira e a Dra. Ana Paula Terezan.

3.4 – Análise do teor de CFT em amostras de leite bovino

3.4.1 – Coleta das amostras de leite

As amostras de leite bovino foram coletadas e fornecidas pelo Professor Drº Luiz Antônio Franco da Silva da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (EVZ-UFG). O projeto foi aprovado pela Comitê de Ética em pesquisa com o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Goiás sob protocolo nº 083/19 e realizado de acordo com os preceitos éticos estabelecidos para os animais de experimentação. Foram

utilizadas seis fêmeas bovinas, leiteiras, primíparas, mestiças Jersey x Holandês, saudáveis e em período de lactação.

Os animais incluídos no experimento receberam cloridrato de ceftiofur em aplicações de 24 em 24 horas, totalizando três aplicações (A1 - 0 horas, A2 - 24 horas e A3 - 48 horas). Foram realizadas aplicações por via intramuscular, na dose indicada pelo fabricante (1 mL do medicamento para cada 50 kg de peso corporal). Imediatamente antes de A1 foram realizadas coletas de 15 mL de leite de cada animal (C0 - 0 horas). Sequencialmente, a partir de A1, foram colhidos, em frascos esterilizados, 15mL de leite de cada animal de seis em seis horas, totalizando 14 colheitas (C1 – 6 horas a C14 – 84horas). As amostras de leite foram acondicionadas em caixa isotérmica com gelo reciclável e, posteriormente, congeladas a -20 °C, para a quantificação do ceftiofur por LC-MS/MS.

Amostras de leite de animais sem uso de CFT foram utilizadas como amostras controle e como amostra branco de referência para o desenvolvimento do método.

3.4.2 – Preparo das amostras de leite bovino – Testes preliminares

Foram realizadas diversas extrações para obter a melhor resposta na recuperação do analito (CFT) na presença da matriz (leite). O leite fortificado representa uma amostra livre do analito de interesse preparada para simular o leite contaminado com o CFT. Para tanto, 1 mg de CFT foi adicionado em 1000 µL de MeOH resultando numa solução 1000 ng.mL⁻¹ que foi utilizada como solução estoque. Esta solução de CFT foi adicionada, em quantidade suficiente, a amostra de leite branco de referência (sem antibiótico) para se obter uma matriz fortificada a 500 ng.mL⁻¹ para realização dos testes. Os testes de extração e *clean-up* realizados são descritos a seguir.

Extração 1 – Extração com ACN acidificada e *clean-up* em SPE C18

Em tubo de polipropileno Tipo Falcon adicionou-se 1 mL de leite fortificado e 4mL ACN acidificada com HCOOH (0,2%). Procedeu-se a agitação da mistura em agitador de tubos (Vórtex, Gehaka, AV-2) por um minuto. Em seguida, o frasco foi centrifugado em Centrífuga (Biolab, B.M.C.) por 10 minutos. Aspirou-se o sobrenadante com o auxílio de uma micropipeta para proceder a extração em fase sólida. O cartucho SPE C18 (5 µm, Agilent) foi condicionado com 3 mL de ACN acidificada e a amostra foi eluída no cartucho. Coletou-se o eluato e conduziu a evaporação a 40°C em concentrador de amostras (TECHNE, FSC496D) até a

secagem completa (por meio de corrente de ar). A amostra foi ressuspensa em 1 mL de MeOH, microfiltrada em filtro para seringa PTFE 0,45 µm (Whatman) e analisada por LC-MS.

Extração 2 – Extração com MeOH:H₂O e *clean-up* em SPE C18

Em tubo de polipropileno Tipo Falcon adicionou-se 1 mL de leite fortificado e 4mL MeOH:H₂O (50:50). Procedeu-se a agitação da mistura em ultrassom (Ultronique, Q5.9/37) por 5 minutos. Em seguida, o frasco foi centrifugado em Centrífuga (Biolab, B.M.C.) por 10 minutos. Separou-se o sobrenadante do precipitado. O cartucho C18 (5 µm, Agilent) foi ativado com 5 mL de MeOH e condicionado com 5 mL de água acidificada.

Para o sobrenadante: procedeu-se a secagem da amostra e ressuspendeu-se em 1 mL de H₂O acidificada com HCOOH (0,1%). A Tabela 2 mostra o procedimento das frações de SPE C18.

Tabela 2. Frações de SPE C18 do sobrenadante para Extração 2

Fração	Solvente (Proporção)	Eluato (Sigla)
1 ^a	Sem solvente, apenas eluição da amostra no cartucho	Fração 1M
2 ^a	Lavagem com 5 mL de água acidificada	Fração 2M
3 ^a	Lavagem com 5 mL de H ₂ O:MeOH (75:25)	Fração 3M
4 ^a	Lavagem com 5 mL de H ₂ O:MeOH (25:75)	Fração 4M
5 ^a	Lavagem com 5 mL de MeOH acidificado	Fração 5M

Todas as frações foram levadas à secagem e ressuspensas em 1 mL de MeOH acidificado e analisadas por LC-MS.

Para o precipitado: acrescentou-se 2 mL de MeOH acidificado e procedeu-se a agitação em Ultrassom (Ultronique, Q5.9/37) por 5 minutos. Em seguida, o frasco foi centrifugado em Centrífuga (Biolab, B.M.C.) por 10 minutos. O cartucho SPE C18 (12mL/2g, Sigma-Aldrich) foi condicionado com 5 mL de MeOH acidificado. O sobrenadante foi adicionado ao cartucho SPE (C18) e as frações estão descritas na Tabela 3.

Todas as frações foram levadas à secagem e ressuspensas em 1 mL de MeOH acidificado e analisadas por LC-MS.

Tabela 3. Frações de SPE C18 do precipitado para o Teste 2

Fração	Solvente (Proporção)	Eluato (Sigla)
1 ^a	Sem solvente, apenas eluição da amostra no cartucho	Fração 6M
2 ^a	Lavagem com 5 mL de MeOH acidificado	Fração 7M

Extração 3 – Extração com ACN e *clean-up* em SPE C18

Em tubo de polipropileno Tipo Falcon adicionou-se 1 mL de leite fortificado e 4 mL ACN acidificada com HCOOH (0,2%). Procedeu-se a agitação da mistura em agitador de tubos (Vórtex, Gehaka, AV-2) por um minuto. Em seguida, o frasco foi centrifugado em Centrífuga (Biolab, B.M.C.) por 10 minutos. Separou-se o sobrenadante do precipitado. O cartucho SPE C18 (12mL/2g, Sigma-Aldrich) foi condicionado com 5 mL de MeOH.

Para o sobrenadante: adicionou-se ao cartucho SPE (C18) e as frações estão descritas na Tabela 4.

Para o precipitado: acrescentou-se 2 mL de MeOH acidificado e procedeu-se a agitação em agitador de tubos (Vórtex, Gehaka, AV-2) por um minuto. Em seguida, o frasco foi centrifugado em Centrífuga (Biolab, B.M.C.) por 10 minutos. Separou-se o sobrenadante do precipitado. O cartucho SPE C18 (12mL/2g, Sigma-Aldrich) foi condicionado com 5 mL de ACN. As frações estão descritas na Tabela 4.

Todas as frações foram levadas à secagem e ressuspendidas em 1 mL de MeOH acidificado e analisadas por LC-MS.

Tabela 4. Frações de SPE C18 do sobrenadante e precipitado para a Extração 3.

	Fração	Solvente (Proporção)	Eluato (Sigla)
Sobrenadante	1 ^a	Sem solvente, apenas eluição da amostra no cartucho	Fração 1A
	2 ^a	Lavagem com 5 mL de MeOH	Fração 2A
	Fração	Solvente (Proporção)	Eluato (Sigla)
Precipitado	1 ^a	Sem solvente, apenas eluição da amostra no cartucho	Fração 3A
	2 ^a	Lavagem com 5 mL de ACN	Fração 4A

Extração 4 – Extração em ACN e *clean-up* em membrana de celulose

Em um tubo tipo *ependorf* adicionou-se 500 μL de leite fortificado (500ng.mL^{-1}) e 500 μL de ACN. Procedeu-se a agitação em agitador de tubos (Vórtex, Gehaka, AV-2) por um minuto. Em seguida, o frasco foi centrifugado em Centrífuga (Thermo Scientific, Sorvall Legend X1R) por 5 minutos a 15000 RPM. O sobrenadante foi filtrado e membrana filtrante de celulose (0,45 μm , Unifil) e analisado por LC-MS.

Extração 5 – Extração em ACN e *clean-up* em DPX com fase RAM/BSA

A) Obtenção de Fase Material de Acesso Restrito - Albumina Sérica Bovina (RAM-BSA) (*Restricted Access Media - Bovine Serum Albumin*) para utilização em extração com pipeta descartável - DPX (*Disposable Pipette Extraction*).

A fase RAM-BSA foi preparada segundo protocolo de Chaves e colaboradores (CHAVES et al., 2015). Para a síntese da Fase RAM-BSA: Em um cartucho SPE-C18 em *manifold* adicionou-se 3 mL de tampão fosfato ($0,05\text{ mol.L}^{-1}$) a pH 6 e 10 mL de solução de BSA (2 mg.mL^{-1}) no cartucho por 15 minutos. Lavou-se o cartucho com 5 mL de água ultrapura e adicionou-se 5 mL de solução de glutaraldeído 25%. Deixou-se em repouso por um período de 5 horas. Acrescentou-se 5 mL de azida de sódio (NaN_3) ($1,0\text{ mg.mL}^{-1}$) passando pelo cartucho até atingir o pH=10. Colocou-se novamente em repouso por 2 horas. Lavou-se a fase sólida por uma hora com água ultrapura e armazenou-se em solução tampão fosfato ($0,05\text{ mol.L}^{-1}$, pH 6) em geladeira ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Ao utilizar a fase RAM-BSA para os procedimentos de extração, deixou-se a solução de repouso exposta ao ar atmosférico por 24 horas.

Em uma ponteira descartável adicionou-se inicialmente fibra de lã de vidro na extremidade inferior e 30 mg de fase RAM-BSA.

Lavagem da fase RAM-BSA na ponteira DPX com 2 mL de água ultrapura em 10 ciclos extração/dessorção com 30 s de equilíbrio. Posteriormente, lavou-se com 1 mL de ACN por duas vezes depois com 1 mL de água ultrapura por duas vezes.

B) Para o processo de extração no leite (DPX)

Em tubo de polipropileno Tipo Falcon adicionou-se 1 mL de leite fortificado e 5 mL ACN. Procedeu-se a agitação da mistura em agitador de tubos (Vórtex, Gehaka, AV-2) por um minuto. Em seguida, o frasco foi centrifugado em Centrífuga (Biolab, B.M.C.) por 10 minutos. Separou-se o sobrenadante do precipitado.

Para o sobrenadante: procedeu-se com a secagem da amostra e ressuspendeu-se em 1 mL de MeOH (Fração F3) e análise por LC-MS/MS.

Para o precipitado: acrescentou-se 1 mL de MeOH e procedeu-se a agitação em agitador de tubos (Vórtex, Gehaka, AV-2) por um minuto. Em seguida, o frasco foi centrifugado em Centrífuga (Biolab, B.M.C.) por 5 minutos. Separou-se o sobrenadante do precipitado. Procedeu-se a extração via DPX (Fase RAM/BSA) em 5 ciclos e as frações estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5. Frações da extração em DPX do precipitado para a Extração 5.

Fração	Solvente (Proporção)	Eluato (Sigla)
1 ^a	Sem solvente, apenas eluição da amostra na DPX	Fração F1
2 ^a	Lavagem da Fase RAM/BSA com 3 mL ACN	Fração F2
3 ^a	Lavagem extra da Fase RAM/BSA com 1 mL ACN	Fração Extra

Todas as frações foram levadas à secagem e ressuspendidas em 1 mL de MeOH acidificado e analisadas por LC-MS/MS.

Extração 6 – Extração em ACN acidificada e *clean-up* em DPX com fase C18 e fase RAM/BSA

Em tubo de polipropileno Tipo Falcon adicionou-se 1mL de leite fortificado e 5mL ACN acidificada com HCOOH (0,2%). Procedeu-se a agitação em agitador de tubos (Vórtex, Gehaka, AV-2) por um minuto. Em seguida o frasco foi centrifugado em Centrífuga (Biolab, B.M.C.) por 10 minutos. Separou-se o sobrenadante do precipitado.

Para o sobrenadante: procedeu-se com a secagem da amostra e ressuspendeu-se em 1 mL de MeOH (Fração F1) e análise por LC-MS/MS.

Para o precipitado: adicionou-se 1 mL de MeOH e procedeu-se a agitação em agitador de tubos (Vórtex, Gehaka, AV-2) por um minuto. Em seguida, o frasco foi centrifugado em Centrífuga (Biolab, B.M.C.) por 5 minutos. Separou-se o sobrenadante do precipitado. Procedeu-se a extração via DPX (4 fases, Tabela 6) em 5 ciclos.

Tabela 6. Parâmetros utilizados no experimento para extração de CFT em leite bovino na Extração 6.

Ponteira	Fase	Solvente	Eluato (Sigla)
1 ^a	C18	ACN acidificada	F2-C18
2 ^{a*}	RAM/BSA	ACN	F2-RAM-SA
3 ^a	RAM/BSA	ACN acidificada	F2-RAM-A1
4 ^a	RAM/BSA	ACN	F2-RAM-A2

*Esse experimento não teve adição de ácido em nenhuma etapa do processo.

Para o sobrenadante: procedeu-se com a secagem da amostra e ressuspendeu-se em 1 mL de MeOH e análise por LC-MS/MS.

Extração 7 – Extração em MeOH e *clean-up* em SPE C18

Em tubo de polipropileno Tipo Falcon adicionou-se 1mL de leite fortificado e 1mL MeOH. Procedeu-se a agitação da mistura em agitador de tubos (Vórtex, Gehaka, AV-2) por um minuto. Em seguida, o frasco foi centrifugado em Centrífuga (Thermo Scientific, Sorvall Legend X1R) em 10000 RPM por 10 minutos. Separou-se o sobrenadante do precipitado. O cartucho SPE C18 (12mL/2g, Sigma-Aldrich) foi ativado com 5 mL de MeOH e condicionado com 5 mL de água acidificada. Procedeu-se a extração via SPE e as respectivas eluições estão descritas na Tabela 7.

Tabela 7. Eluições em cartucho C18 para a Extração 7

Eluição	Solvente (Proporção)	Eluato (Sigla)
1	Sem solvente, apenas eluição da amostra no cartucho	Fração 1
2	5 mL de água acidificada	Fração 2
3	5 mL de água acidificada:MeOH (75:25)	Fração 3
4	5 mL de água acidificada:MeOH (25:75)	Fração 4
5	5 mL de MeOH	Fração 5

Todas as frações foram levadas à secagem e ressuspendidas em 1 mL de MeOH:H₂O (50:50) e analisadas por LC-MS/MS.

Extração 8 – Extração em ACN e MeOH

Em tubo de polipropileno tipo *eppendorf* adicionou-se 1mL de leite fortificado e 1mL de solvente (Tabela 8). Agitação em Ultrassom (Ultronique, Q5.9/37) por 5 minutos. Em seguida, procedeu-se a centrifugação da amostra em Centrífuga (Thermo Scientific, Sorvall Legend X1R) a 10000 RPM por 10 minutos). Separou-se o sobrenadante do precipitado. Analisou-se o sobrenadante por LC-MS/MS.

Tabela 8. Solventes utilizados na extração do CFT nos experimentos da Extração 8

Solvente (Proporção)	Eluato (Sigla)
ACN	TO1
MeOH	TO2
ACN:H ₂ O (50:50)	TO3
MeOH:H ₂ O (50:50)	TO4

Extração 9 – Extração em MeOH:H₂O e *clean-up* em SPE C18

Em tubo de polipropileno Tipo Falcon adicionou-se 1 mL de leite fortificado e 1 mL de MeOH:H₂O (50:50). Agitação em Ultrassom (10 minutos). Em seguida, procedeu-se a centrifugação em Centrífuga (10 minutos – 10000 RPM). Separou-se o sobrenadante do precipitado. O cartucho SPE C18 (12mL/2g, Sigma-Aldrich) foi ativado com 5 mL de MeOH e condicionado com 5 mL de água acidificada. Procedeu-se a extração via SPE do sobrenadante e as respectivas eluições estão descritas na Tabela 9.

Tabela 9. Eluições em cartucho C18 para a Extração 9

Eluição	Solvente (Proporção)	Eluato (Sigla)
1	Sem solvente, apenas eluição da amostra no cartucho	Fração 1
2	5 mL de água acidificada	Fração 2
3	5 mL de água acidificada:MeOH (75:25)	Fração 3
4	5 mL de água acidificada:MeOH (25:75)	Fração 4
5	5 mL de MeOH	Fração 5

Todas as frações foram levadas à secagem e ressuspensas em 1 mL de MeOH acidificado e analisadas por LC-MS.

Extração 10 - Extração em MeOH a baixa temperatura

Em tubo tipo *eppendorf* adicionou-se 500 µL de leite fortificado e 1 mL de MeOH a baixa temperatura. Procedeu-se a agitação da mistura em agitador de tubos (Vórtex, Gehaka, AV-2) por um minuto. Em seguida, a amostra foi centrifugada em Centrífuga (Hettich, Mikro 200) a 15000 RPM por 5 minutos. Separou-se o sobrenadante do precipitado. A fase líquida foi evaporada (a 40°C) até a secagem completa e ressuspensa na Fase móvel (H₂O acidificada 0,1%:ACN, (70:30, v/v)).

Extração 11 - Extração em MeOH gelado e LLE

Em tubo de polipropileno tipo *eppendorf* adicionou-se 500 µL de leite fortificado e 1 mL de MeOH gelado. Procedeu-se a agitação da mistura em agitador de tubos (Vórtex, Gehaka, AV-2) por um minuto. Em seguida, a amostra foi centrifugada em Centrífuga (Hettich, Mikro 200) a 15000 RPM por 5 minutos. Retirou-se o sobrenadante para um novo *eppendorf* e adicionou-se 1 mL de Hexano. Procedeu-se com agitação manual (30 segundos) e Centrifugação em Centrífuga (Hettich, Mikro 200) a 15000 RPM por 5 minutos. Aspirou-se a parte superior (Fração 1) e a parte inferior (Fração 2). Todas as frações foram secas (40°C) e ressuspensas na Fase Móvel (H₂O acidificada 0,1%:ACN, (70:30, v/v)).

Extração 12 - Extração em MeOH a baixa temperatura e LLE

Em um tubo de polipropileno tipo Falcon adicionou-se 1 mL de leite fortificado e 1 mL de MeOH a baixa temperatura. Procedeu-se a agitação da mistura em agitador de tubos (Vórtex, Gehaka, AV-2) por um minuto. Em seguida, a amostra foi centrifugada em Centrífuga (Thermo Scientific, Sorvall Legend X1R) por 3 minutos a 10000 RPM em 15 °C. Separou-se o sobrenadante do precipitado. Transferiu-se o sobrenadante para outro tubo Falcon e adicionou-se 2 mL de hexano. Agitou-se a mistura por tombamento e procedeu-se a centrifugação (1 minuto/4000 RPM). Retirou-se a maior parte da fase superior (que contém o hexano) e transferiu-se a fase inferior para um tubo de ensaio e procedeu-se a secagem da amostra em SpeedVac (40 °C). Adicionou-se 500 µL de MeOH e agitou-se. Em seguida,

centrifugou-se a amostra e transferiu-se para um *vial* com *insert* para posterior análise por LC-MS/MS.

Extração 13 – Buscando o analito na LLE

Esse experimento foi realizado da mesma forma que o Teste 12, mas na intenção de analisar onde o analito seria extraído, foram coletadas todas as fases do processo. Separou-se o sobrenadante e precipitado. A Tabela 10 apresenta a descrição dessas frações.

Tabela 10. Fase analisada por LLE e procedimento adotado.

Sigla	Fase	Procedimento
FP	Fase precipitada	No tubo de vidro foi adicionado ao precipitado mais 500 µL de água deionizada procedendo a agitação em Ultrassom por 5 minutos. Procedeu-se com a secagem da amostra e sua posterior ressuspensão e análise por LC-MS.
FA	Fase “aquosa”	Ao sobrenadante o procedimento continua o mesmo do Teste 12.
FO	Fase orgânica	A fase contendo o hexano foi seca e ressuspensa e analisada por LC-MS.

3.5 – Performance Analítica

Para avaliar o desempenho analítico da técnica de LC-MS foram construídas curvas analíticas com amostras de leite branco de referência enriquecidas com o padrão de CFT. As curvas foram construídas pela área dos picos obtidos para o íon fragmento m/z 241. A linearidade foi avaliada com as seguintes concentrações (1, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 ng.mL⁻¹).

Foram avaliadas as seguintes figuras de mérito para o experimento: limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), exatidão (erro relativo), precisão (desvio padrão relativo) e recuperação. Equações 1 e 2 expressam o cálculo de LOD e LOQ, respectivamente:

$$LOD = \frac{(3,3.SB)}{m} \quad \text{(Equação 1)}$$

$$LOQ = \frac{(10.SB)}{m} \quad \text{(Equação 2)}$$

onde sB representa o desvio padrão da medida de 10 análises do branco representa a inclinação da curva de calibração. Exatidão e precisão foram determinadas em três níveis de concentração 45, 150, 350 ng.mL⁻¹ em replicatas (n=3). A exatidão foi obtida por:

$$E(\%) = \frac{(CE-CT)}{CT} \cdot 100 \quad (\text{Equação 3})$$

onde E(%) é o erro relativo, expresso em porcentagem, CE representa a concentração analisada (experimental) e CT é a concentração teórica. A precisão foi calculada por:

$$RSD = \left(\frac{DP}{CT} \right) \cdot 100 \quad (\text{Equação 4})$$

onde RSD representa o desvio padrão relativo, expresso em porcentagem, e DP representa o desvio-padrão. A recuperação foi determinada pela fortificação das amostras com 75, 175, and 375 ng.mL⁻¹ e foi calculada por:

$$Rec(\%) = \left(\frac{CE}{CT} \right) \cdot 100 \quad (\text{Equação 5})$$

3.6 – Análise de CFT em amostras reais de leite bovino

Após o desenvolvimento do método, determinou-se a concentração presente nas amostras reais de leite bovino (conforme apresentado na Seção 3.4.1 – Coleta das amostras de leite). Foram obtidos os valores das áreas dos picos no qual foram convertidos em concentração (em ng.mL⁻¹) a partir da curva de calibração.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Análise de CFT em leite bovino via PSI-MS

Inicialmente, foram realizados testes para a detecção do analito utilizando a técnica de PSI-MS em LCQ na concentração de 1000 ng.mL^{-1} em leite bovino. As intensidades obtidas para o íon de m/z 524 são apresentadas na Figura 5.

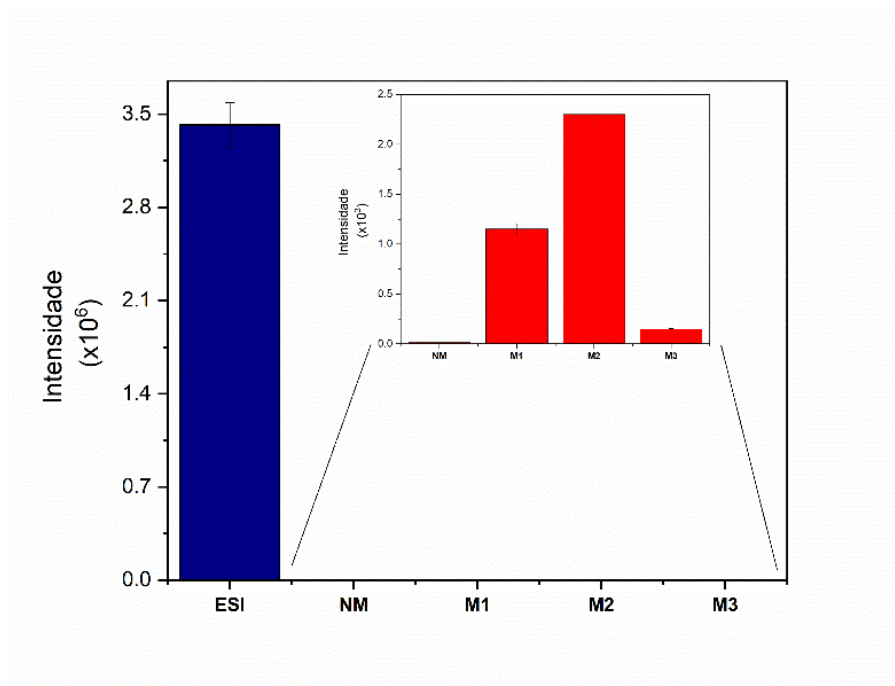


Figura 5. Intensidades obtidas no experimento de PSI-MS (barras em vermelho) para o CFT em leite bovino na concentração de 1000 ng.mL^{-1} . NM – papel não modificado; M1 – papel modificado 1 (solução de pirrol em ACN com HNO_3); M2 - papel modificado 2 (solução de pirrol em água com NaClO); M3 - papel modificado 3 (solução de pirrol com $\text{FeCl}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

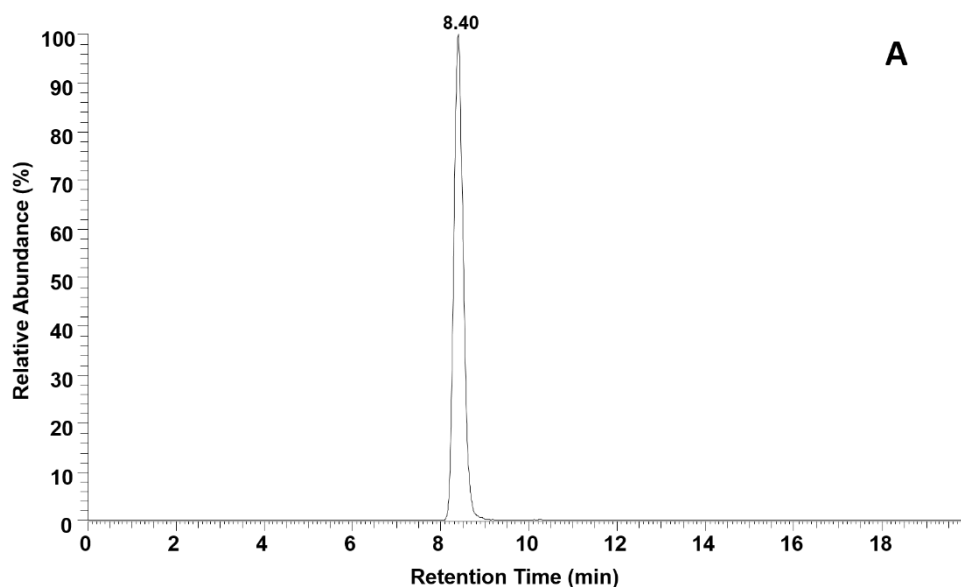
Nos experimentos de PSI-MS observa-se que o papel modificado é mais eficiente que o papel não modificado. O papel Modificado 2 (pirrol em água e NaClO) apresentou melhor resposta quando comparado aos demais, indicando que há uma possível interação entre os grupos de polipirrol e as moléculas de CFT. Entretanto, os experimentos realizados em ESI, se mostraram muito mais eficientes para detecção do analito quando comparado ao PSI-MS. A intensidade obtida no ESI foi de $3,42\text{E}6$ enquanto no PSI a intensidade média é $9,02\text{E}2$. Para a análise de PSI, o volume, a natureza do solvente e a concentração das espécies analisadas afetam a intensidade dos sinais e a duração do *spray*. Soluções aquosas (com mais de 50% de água) desfavorecem a formação do *spray* devido a elevada tensão superficial

(dificulta a ocorrência de explosões coulômbicas). Por outro lado, solventes muito voláteis secam rapidamente dificultando a formação do *spray* (ESPY et al., 2012).

Como as intensidades obtidas para todos os papéis foram muito baixas, optou-se por proceder com o método de detecção via ESI.

4.2 – Aspectos gerais do CFT em LC-MS/MS

O ceftiofur foi submetido a análise de LC-MS/MS. Em todos os ensaios, o CFT foi detectado na forma de molécula protonada $[M+H]^+$. O CFT pode ser detectado em baixas concentrações, na ordem de ng.mL^{-1} . A Figura 6 apresenta a detecção do analito no modo *fullscan* e sua fragmentação (modo SRM, *Selected Reaction Monitoring* ou Monitoramento de Reações Seleccionadas) em solução de 100 ng.mL^{-1} . A intensidade de sinal para detecção é aproximadamente $4,00\text{E}6$ (modo *fullscan*) e $1,64\text{E}4$ (modo SRM). Optou-se por realizar as detecções via MS/MS para melhorar a especificidade do método.



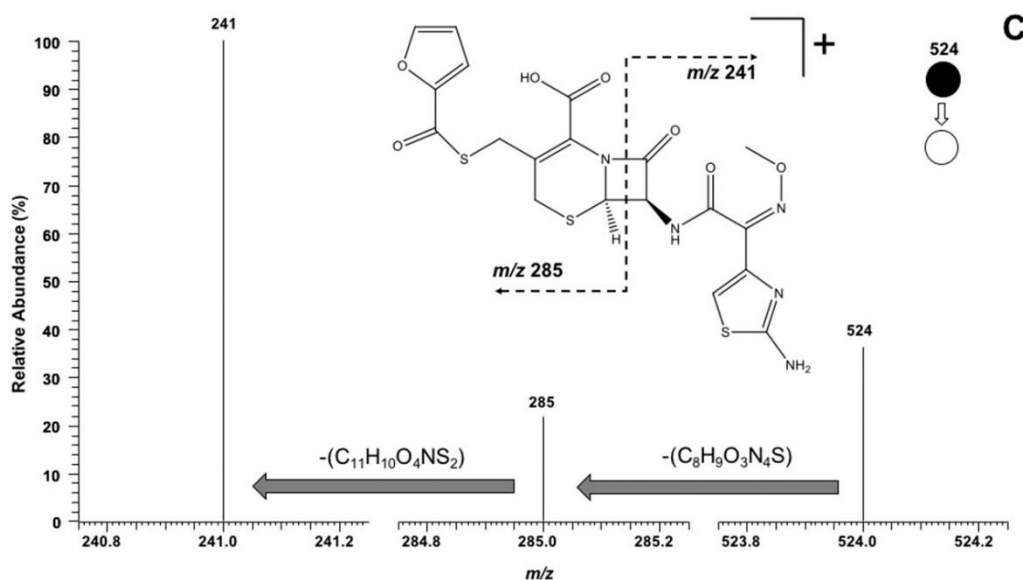
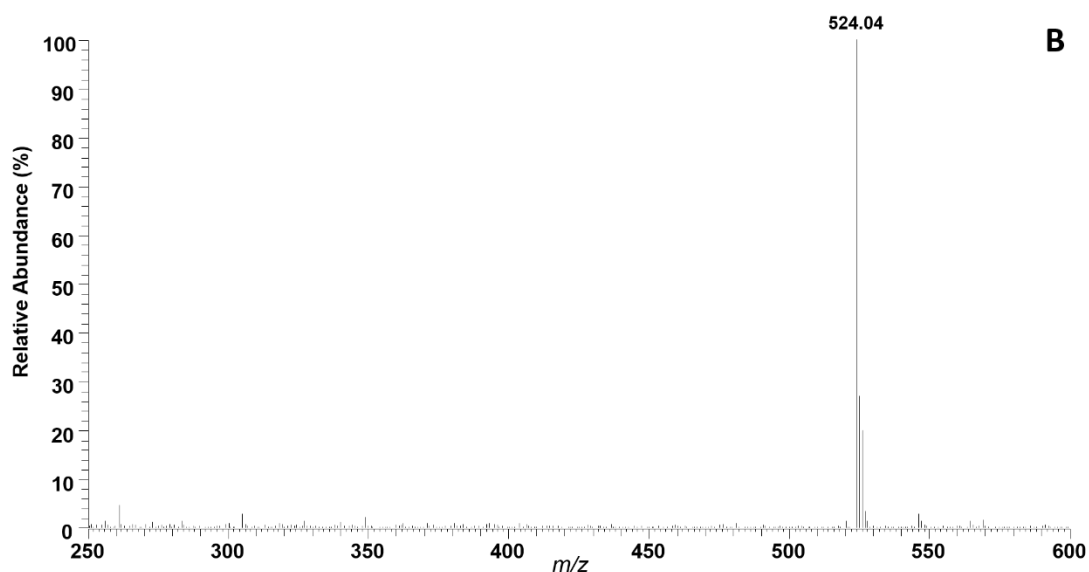


Figura 6. (a) Cromatograma (b) Ion molecular para o analito de interesse, ceftiofur na concentração de 100 ng.mL^{-1} com detecção em equipamento do tipo triplo quadrupolo e (c) fragmentação da molécula de CFT na concentração de 100 ng.mL^{-1} .

O espectro MS/MS do CFT apresenta um fragmento intenso com valor de m/z 241 que representa um dos produtos da fragmentação do íon precursor, sendo este íon selecionado para quantificação. O pico de m/z 285 representa o íon de confirmação. O mecanismo de fragmentação foi proposto em um trabalho anterior (LIM et al., 2011) e os dados obtidos estão de acordo com a literatura. Optou-se realizar as detecções por meio de fragmentação para aprimorar a especificidade do método. O fragmento 241 não apresenta metabolização e é

idêntico tanto para o ceftiofur quanto para o metabólito ativo desfuroilceftiofur, uma vez que os processos de fragmentação ocorrem no anel β -lactâmico.

A Figura 7 apresenta o comparativo das intensidades de sinal variando-se as energias de colisão no espectrômetro de massas. Com base nesses resultados foi definido a energia de colisão de 18 eV.

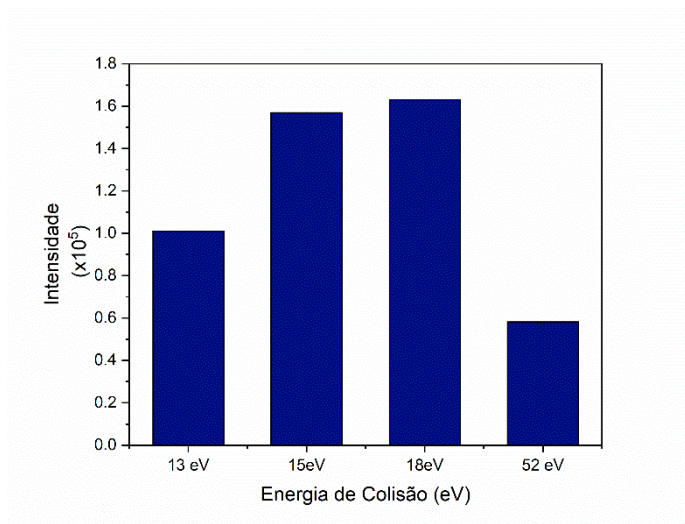


Figura 7. Comparativo das intensidades de sinal variando-se as energias de colisão no espectrômetro de massas. Infusão direta das soluções de concentração de 100 ng.mL⁻¹.

Como o leite representa uma matriz complexa, uma das principais etapas que um analista deve levar em conta ao analisar uma amostra é o seu pré-tratamento. Nesse aspecto, foram testadas várias metodologias para o preparo de amostras de leite.

4.3 – Testando metodologias de extração e *clean-up* do leite bovino

O preparo de amostra foi testado em várias condições diferentes avaliando a eficiência dos métodos para posterior aplicação em amostras reais de leite bovino. A maioria dos métodos testados utilizavam SPE (C18 e outros adsorventes) como método de *clean-up*. Mas não foi possível obter resultados com boa resposta de recuperação do analito. Nesse aspecto, optou-se por realizar o procedimento de LLE para melhorar a eficiência de extração e obter maior quantidade extraída do analito. O método mais adequado para realização dos experimentos é o Procedimento N°12 (veja Seção 4.4.2 – Metodologia). A seguir, serão apresentadas as respostas de todos os testes preliminares realizados.

4.3.1 – Extração 1 – Extração com ACN acidificada e *clean-up* em SPE C18

Na extração 1 (Figura 8), a recuperação obtida no experimento foi de 18,75%. Como esse teste foi feito apenas a coleta do eluato de uma única eluição, é possível que o analito tenha ficado retido na fase sorvente do cartucho. Na extração 2 foi realizada a coleta de mais frações para avaliar se a lavagem do cartucho melhoraria a resposta de recuperação.

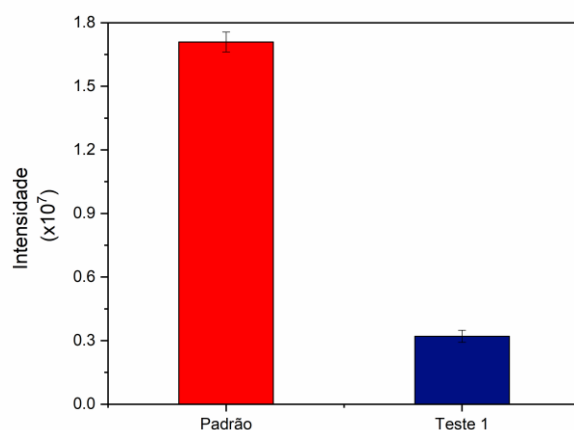


Figura 8.Comparação da Extração 1 com o Padrão de CFT em leite bovino.

4.3.2 – Extração 2 – Extração com MeOH:H2O e *clean-up* em SPE C18

Este teste foi realizado utilizando o método de extração via SPE, coletando as sete frações obtidas no processo de extração (cinco do sobrenadante e duas do precipitado) utilizando MeOH como solvente extrator em todo o processo. A Figura 9 apresenta o resultado obtido para a análise na concentração de 500 ng.mL⁻¹.

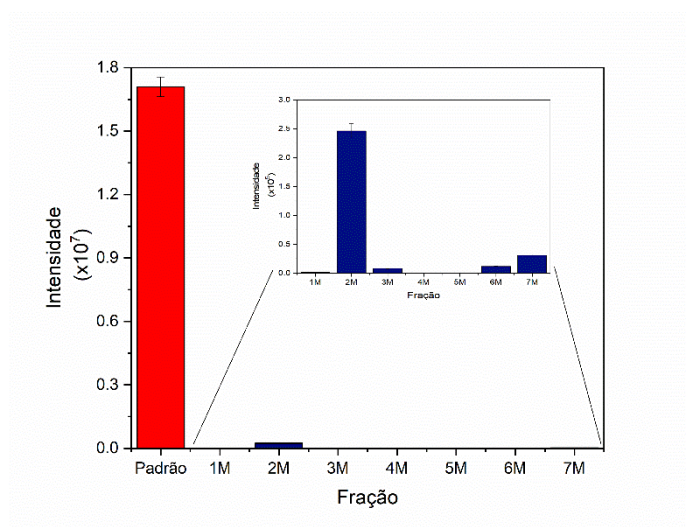


Figura 9. Comparação das sete frações obtidas na Extração 2 com o Padrão de CFT em leite bovino.

O somatório de todas as frações totalizou uma recuperação de 1,75%. A fração 2M foi a que apresentou melhor resposta quando comparada a outras. Nesta fração utilizou-se água acidificada como solvente extrator, sendo o solvente de maior polaridade. A solubilidade do analito em pH ácido é próxima a zero ($\sim 0,02 \text{ mg.mL}^{-1}$). Em pH neutro a solubilidade aumenta para $4,23 \text{ mg.mL}^{-1}$ e em pH alcalino (~ 8) a solubilidade aumenta para $16,85 \text{ mg.mL}^{-1}$ (CHEMICALIZE - INSTANT CHEMINFORMATICS SOLUTIONS, [s.d.]).

4.3.3 – Extração 3 – Extração com ACN e *clean-up* em SPE C18

Este teste foi realizado utilizando o método de extração via SPE, coletando as quatro frações obtidas no processo de extração (duas do sobrenadante e duas do precipitado) utilizando ACN (não acidificada) como solvente extrator no início do processo. A Figura 10 apresenta o resultado obtido para a análise na concentração de 500 ng.mL^{-1} .

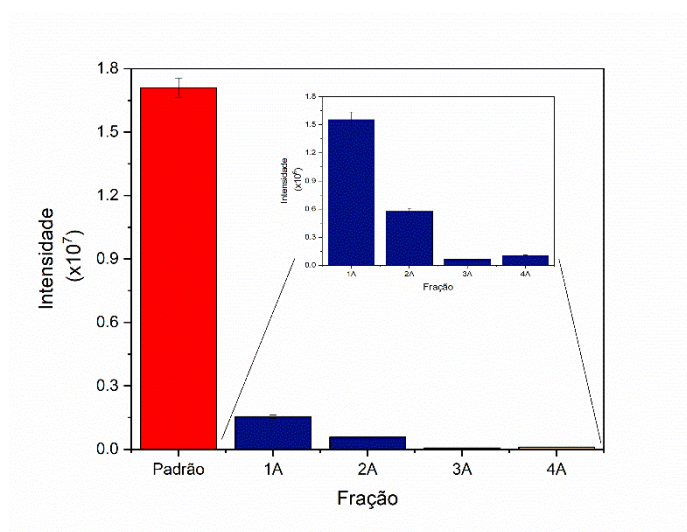


Figura 10. Comparação das quatro frações obtidas na Extração 3 com o Padrão de CFT em leite bovino.

O somatório de todas as frações totalizou uma recuperação de 13,48% sendo a Fração 1A a que apresentou melhor resposta experimental. Nessa fração não é utilizado solvente extrator no cartucho SPE, sendo aproveitado apenas o eluato na primeira eluição no processo.

A Fração 2A apresentou a segunda melhor resposta, indicando que a maior parte do analito está presente no sobrenadante. Apenas uma pequena fração fica no precipitado.

4.3.4 – Extração 4 – Extração em ACN e *clean-up* em membrana de celulose

A Figura 11 apresenta o resultado obtido para a análise na concentração de 500 ng.mL⁻¹. A recuperação obtida no experimento foi de 1,92%. O analito pode ter ficado retido nos poros do papel e com isso obteve-se um baixo resultado da recuperação. A celulose é um polímero com característica polar e pode ter apresentado interação forte com a área superficial polar da molécula de CFT.

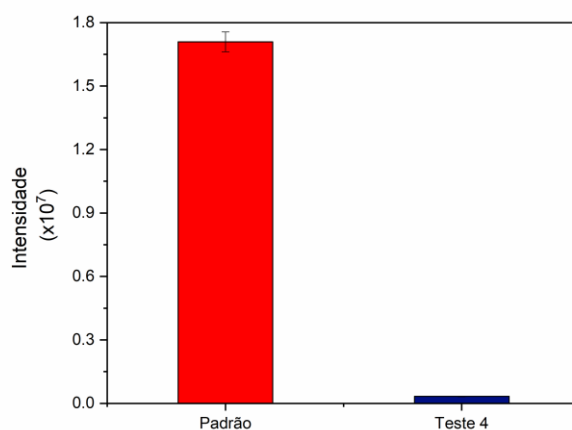


Figura 11. Comparação da Extração 4 com o Padrão de CFT em leite bovino.

4.3.5 – Extração 5 – Extração em ACN e *clean-up* em DPX com fase RAM/BSA

A Figura 12 apresenta o resultado obtido para a análise na concentração de 500 ng.mL⁻¹ de quatro frações (uma para o sobrenadante e três para o precipitado). A recuperação total obtida no experimento foi de 19,91% sendo a F1 a fração com maior intensidade. Essa fração representa o precipitado eluido diretamente no sistema DPX. As frações F2 e extra representam um somatório de aproximadamente 3%. Enquanto a F3 apresenta recuperação igual a 1,84%.

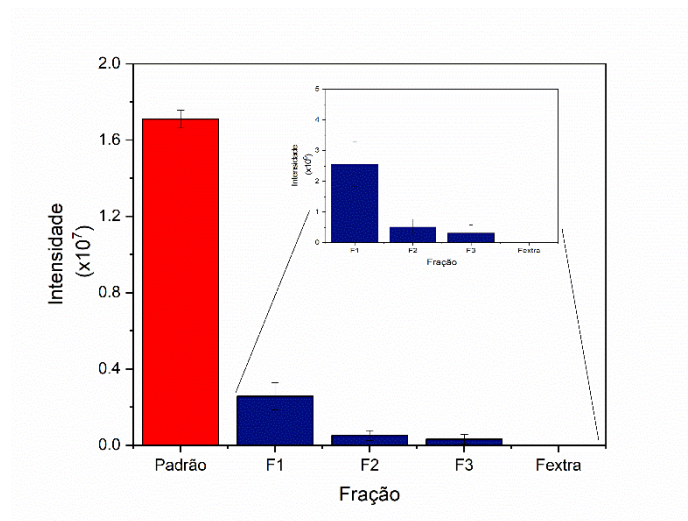


Figura 12. Comparação das quatro frações obtidas na Extração 5 com o Padrão de CFT em leite bovino.

4.3.6 – Extração 6 – Extração em ACN acidificada e *clean-up* em DPX com fase C18 e fase RAM/BSA

O Teste 6 foi um complemento ao Teste 5, utilizando o sistema de extração via DPX com fases sorventes diferentes (C18 e RAM/BSA). A Figura 13 apresenta o resultado obtido para a análise na concentração de 500 ng.mL^{-1} . A recuperação obtida no experimento foi extremamente baixa (0,73%). Não foi possível extrair o CFT através das ponteiros DPX. As intensidades das frações estão na ordem de 10^4 enquanto o padrão está na ordem de 10^7 .

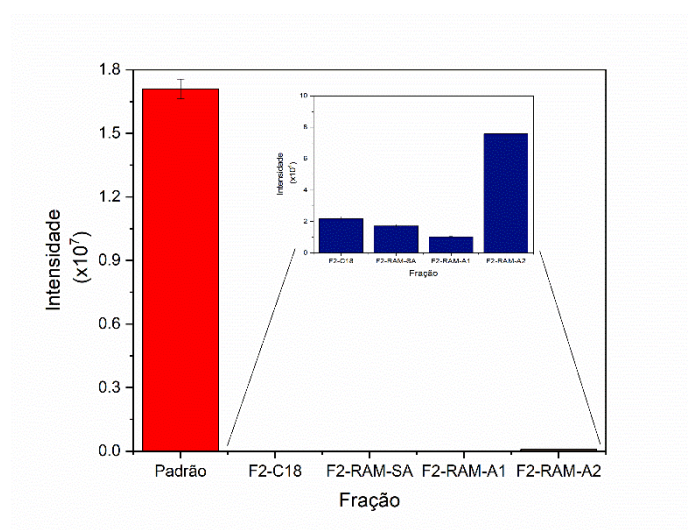


Figura 13. Comparação das quatro frações obtidas na Extração 6 com o Padrão de CFT em leite bovino.

4.3.7 – Extração 7 – Extração em MeOH e *clean-up* em SPE C18

Este teste foi realizado utilizando o método de extração via SPE coletando as cinco frações obtidas no processo de extração (todas do sobrenadante), utilizando MeOH como solvente extrator. A Figura 14 apresenta o resultado obtido para a análise na concentração de 500 ng.mL⁻¹.

A recuperação total obtida no experimento foi de 13,55% sendo as Frações 2 e 4 as de maior intensidade. Essas frações representam extração com água ultrapura e mistura H₂O:MeOH (25:75) somando 13,25% da recuperação total.

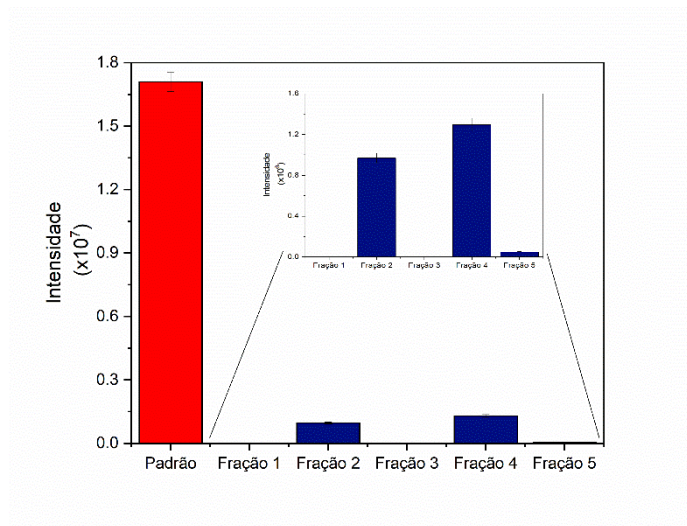


Figura 14. Comparação das cinco frações obtidas na Extração 7 com o Padrão de CFT em leite bovino.

4.3.8 – Extração 8 – Extração em ACN e MeOH

O teste foi realizado em solventes distintos com agitação em ultrassom. A Figura 15 apresenta o resultado obtido para a análise na concentração de 500 ng.mL⁻¹. Os Testes T02 e T04 foram os que apresentaram melhor resposta no experimento. Usam como solvente, respectivamente, MeOH e MeOH:H₂O (50:50). As recuperações obtidas nesse experimento são: 26,43% para o T02 e 44,88% para o T04. Os testes T01 e T03 apresentaram um valor de aproximadamente 5% cada.

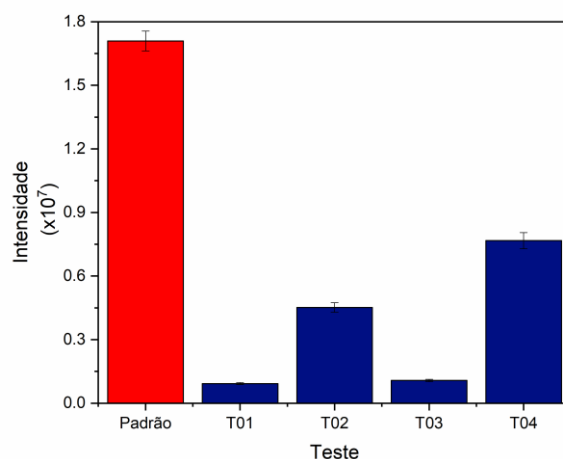


Figura 15. Comparação de quatro ensaios obtidos na Extração 8 e o Padrão de CFT em leite bovino.

4.3.9 – Extração 9 – Extração em MeOH:H₂O e *clean-up* em SPE C18

Este teste foi realizado utilizando o método de extração via SPE coletando as cinco frações obtidas no processo de extração (todas do sobrenadante) utilizando MeOH como solvente extrator. A Figura 16 apresenta o resultado obtido para a análise na concentração de 500 ng.mL⁻¹. A recuperação total obtida no experimento foi de 4,89%. Dentre as frações analisadas, a F3 foi a que apresentou melhor resposta (4,65%), utilizando H₂O:MeOH (75:25) como mistura para eluição do analito.

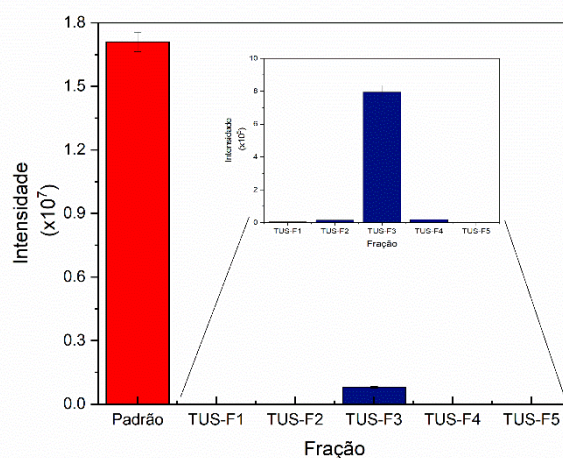


Figura 16. Comparação das cinco frações obtidas na Extração 9 com o Padrão de CFT em leite bovino.

4.3.10 – Extração 10 - Extração em MeOH a baixa temperatura

A Figura 17 apresenta o resultado obtido para a análise na concentração de 500 ng.mL⁻¹. A recuperação obtida no experimento foi de 24,25%. Comparando-se os resultados obtidos para LLE, obtém-se melhor resposta que nos testes realizados por SPE. No entanto, optou-se por continuar os testes em LLE.

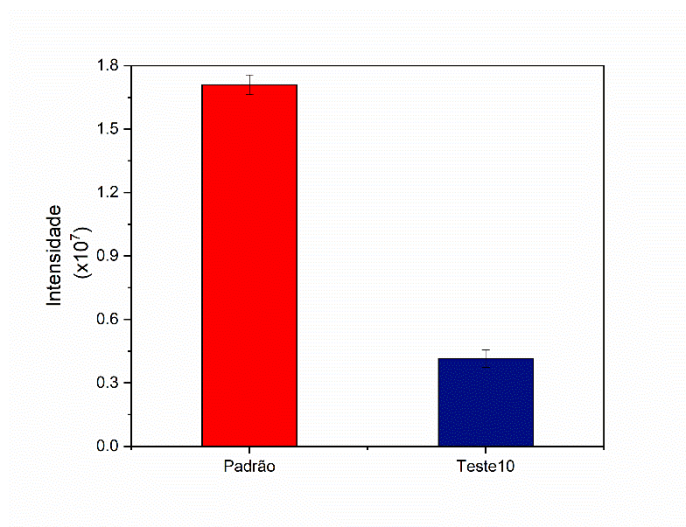


Figura 17. Comparação da Extração 10 com o Padrão de CFT em leite bovino.

4.3.11 – Extração 11 - Extração em MeOH a baixa temperatura e LLE

A Figura 18 apresenta o resultado obtido para a análise na concentração de 500 ng.mL⁻¹. As frações 1 e 2 representam as coletas na LLE. As recuperações foram: 13,23% (Fração 1) e 3,33% (Fração 2). Mesmo com baixas recuperações, persistiu-se na extração por LLE aumentando a quantidade de leite no experimento.

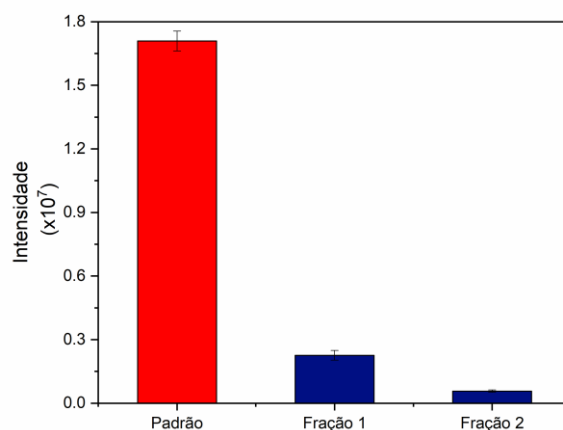


Figura 18. Comparação das duas frações obtidas na Extração 11 com o Padrão de CFT em leite bovino.

4.3.12 – Extração 12 - Extração em MeOH a baixa temperatura e LLE

A Figura 19 apresenta o resultado obtido para a análise na concentração de 500 ng.mL⁻¹. A recuperação obtida para esse experimento foi de 85,34%. Como obteve-se melhor resposta nessas condições os ensaios subsequentes foram realizados nas mesmas condições.

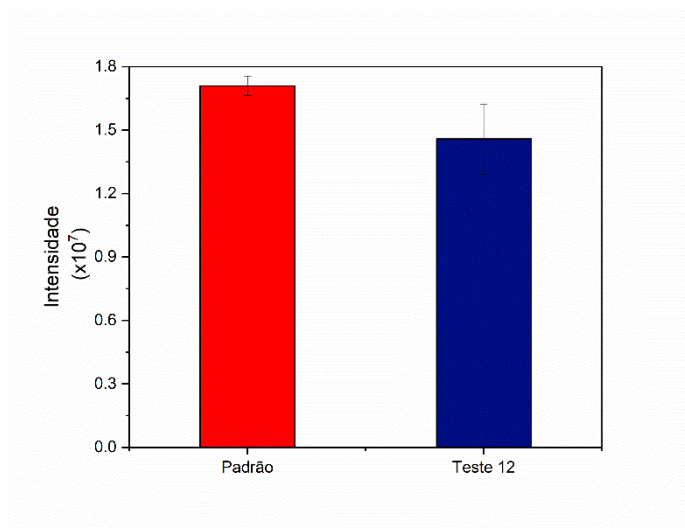


Figura 19. Comparação do Teste 12 com o Padrão de CFT em leite bovino.

4.3.13 – Extração 13 – Buscando o analito na LLE

Durante a otimização do método de extração, investigou-se as frações líquido-líquido: fase orgânica, fase aquosa e fase precipitada proteica, tentando obter a fração onde obtivemos a maior concentração do antibiótico. A Figura 20 apresenta o resultado obtido para a análise na concentração de 100 ng.mL^{-1} . Como pode ser observado na figura, a maior área de pico obtida para as três frações coletadas apresentou melhor resposta (68,80%) na FA (fração contendo MeOH) sendo essa a fração escolhida para a coleta nos experimentos. Na FP o resultado foi de 31,17% e na FO, 0,03%.

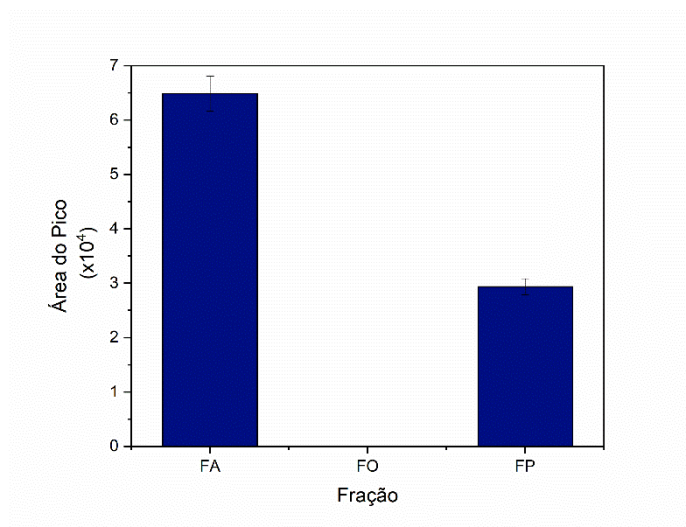


Figura 20. Comparação das áreas de pico obtidas nas três frações extraídas no experimento.

Esses resultados estão de acordo com o esperado, uma vez que $K_{o/w}$ para CFT é 0,54 (LEWIS et al., 2016), o que sugere maior afinidade pela fase polar.

4.4 – Performance Analítica para o leite fortificado

O desempenho analítico do método desenvolvido foi avaliado por parâmetros, tais como linearidade (Figura 21) repetibilidade (Tabela 11), limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ), seguindo os critérios das normativas brasileiras (Tabela 12).

O método desenvolvido apresentou linearidade na faixa de 1 a 500 ng.mL^{-1} , apresentando coeficiente de correlação da ordem de 0,9791. O modelo linear explica aproximadamente 98% da variância dos dados de acordo com a análise ANOVA. Os valores de LOD e LOQ obtidos neste estudo foram 0,26 e $0,80 \text{ ng.mL}^{-1}$, respectivamente (Tabela 12).

Esses valores estão de acordo com outros métodos para determinação de CFT em amostras de leite bovino como encontrados na literatura para técnicas semelhantes (Tabela 12).

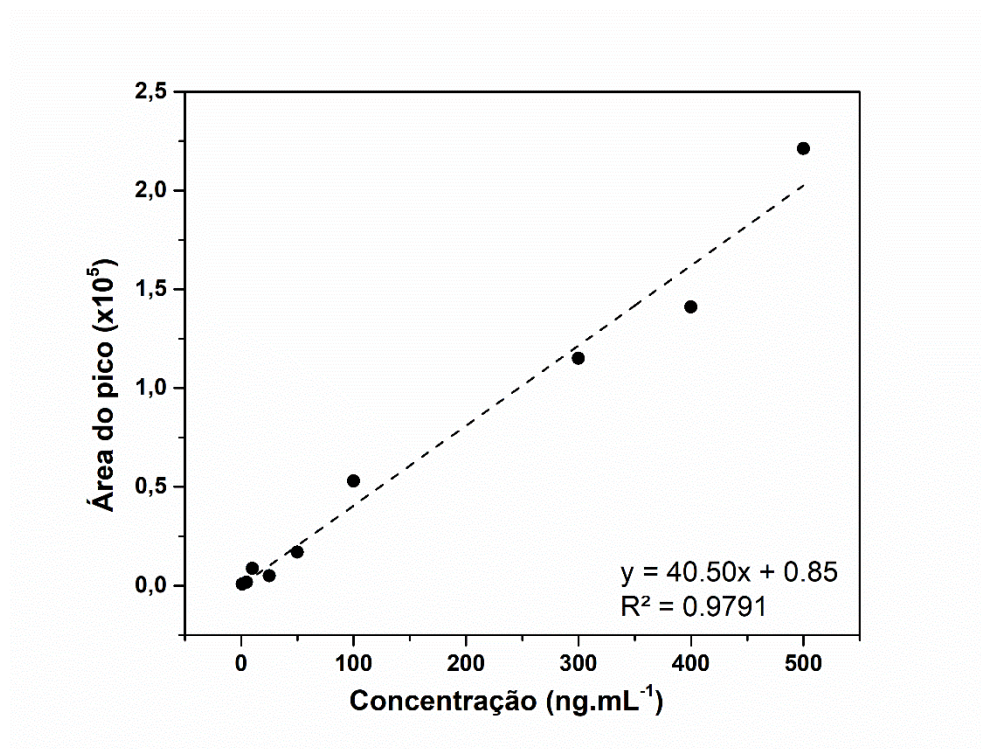


Figura 21. Curva de calibração para o CFT.

Foram avaliadas as precisões intra-dia e inter-dia do método desenvolvido e os resultados são apresentados na Tabela 11. Em geral, as agências reguladoras costumam aceitar faixas de recuperação entre 70 a 120% para métodos analíticos envolvendo matrizes alimentares, com precisão, expresso como coeficiente de variação, inferior a 20% (FAO, 2023; MAPA, 1999). A metodologia apresentou menores valores de CV% (Tabela 11), o que denota a boa precisão do método. Além disso, a recuperação variou de 85 a 102,7%, o que está de acordo com a recomendação da agência reguladora brasileira.

A Tabela 12 apresenta resultados de determinação de CFT em leite bovino utilizando diferentes técnicas de extração e detecção.

Tabela 11. Figuras de mérito para o método LC-MS/MS desenvolvido para o CFT das análises em leite bovino

	Concentração Teórica (ng.mL ⁻¹)	Concentração Experimental (ng.mL ⁻¹)	Desvio-padrão (DP)	Coefficiente de variação (CV%)	Recuperação (%)
Intra-dia (n=5)	45,00	43,28	1,38	3,2	96,2
	150,00	127,99	3,31	2,6	85,0
	350,00	338,08	7,38	2,2	96,6
Inter-dia (n=3)	45,00	46,02	1,95	4,4	102,7
	150,00	137,40	8,02	5,5	91,6
	350,00	330,63	23,71	7,3	94,5

Tabela 12. Comparação do método proposto no presente estudo com outros métodos encontrados na literatura para determinação de CFT em leite bovino

Método de extração	Método de detecção	LOD (ng.mL ⁻¹)	LOQ (ng.mL ⁻¹)	Referência
Não necessita	Voltametria de onda quadrada	0,20	0,65	(BARBOSA et al., 2011)
SPE ^a	UPLC-MS/MS	0,05	0,10	(KANG et al., 2018)
MISPE ^b	LC-UV	1,50	5,00	(CHENG et al., 2021)
SPME ^c	HPLC-DAD	10,00	30,00	(CHEN; YE, 2016)
DSPE ^d	UPLC-MS/MS	0,20	0,60	(DORIVAL-GARCÍA et al., 2016)
MSPD ^e	HPLC-DAD	11,80	35,70	(KARAGEORGOU; SAMANIDOU; PAPADOYANNIS, 2012)
LLE ^f	RP-LC-DAD	20,00	50,00	(MAIA TOALDO et al., 2012)
MISPE ^b	UPLC-MS/MS	1,50	5,00	(BAEZA et al., 2016)
LLE ^f	LC-MS/MS (ESI)	0,26	0,80	Presente estudo

^aExtração em fase sólida; ^bExtração em fase sólida com polímero molecularmente impresso;

^cMicroextração em fase sólida; ^dExtração em fase sólida dispersiva; ^eDispersão da Matriz em fase sólida; ^fExtração líquido-líquido.

Maia e colaboradores (2012) utilizaram a LLE, uma das técnicas empregadas nesse trabalho, e a análise foi feita utilizando um sistema de cromatografia líquida com detector de

arranjo de diodos (DAD). Os autores obtiveram um método com $R^2=0,992$, $LOD=20 \text{ ng.mL}^{-1}$, $LOQ=50 \text{ ng.mL}^{-1}$, e recuperação=99,7% (MAIA TOALDO et al., (2012). Dorival-García e colaboradores (2016) utilizaram o aparato analítico UPLC-MS/MS e obtiveram valores de LOD e LOQ de 0,2 e 0,6 ng.mL^{-1} , respectivamente. Para tanto, os autores utilizaram um método de extração assistida por ultrassom, seguido de limpeza por extração dispersiva em fase sólida (d-SPE) (DORIVAL-GARCÍA et al., 2016). Como nos trabalhos citados, o presente estudo apresenta resposta com boa seletividade e sensibilidade do método para quantificação de CFT em leite bovino.

4.5 - Análise de CFT em amostras reais de leite bovino

Após a otimização do método de extração e determinação da performance analítica em leite fortificado, o método foi aplicado em amostras reais de leite bovino. As amostras foram submetidas ao preparo descrito no Tópico 3.4.2 (Extração 12 - Extração em MeOH gelado e LLE) e injetadas nas condições de LC-MS/MS estabelecidas. Calculou-se a concentração de CFT presente nas amostras reais através da área do cromatograma obtido com o uso da curva de analítica.

A Figura 22 apresenta o resultado individual para as amostras de leite obtidas a partir de seis vacas avaliadas. Apenas um animal apresentou concentração de CFT acima do LMR nos diferentes horários de coleta (6h, 12h, 78h), o que representa apenas 3,33% das amostras. Foi feita a média das áreas dos picos obtidos em cada tempo de coleta (das seis vacas analisadas) apresentando resultados que variaram de 0,98 a 63,50 ng.mL^{-1} . Este resultado mostra que todas as médias obtidas estavam abaixo do LMR, indicando que estão em conformidade com a legislação.

A Figura 23 apresenta o valor médio da resposta das seis vacas em cada tempo de coleta. A concentração apresentada no gráfico é acumulada, por exemplo, o valor da concentração obtida no tempo 12h é somado com a concentração obtida no tempo anterior (6h) e assim sucessivamente. Não houve aumento significativo na concentração de CFT após 72 horas, sendo a concentração máxima de CFT obtida 12 horas após a primeira aplicação do medicamento, com a concentração acumulada atingindo 320,30 ng.mL^{-1} .

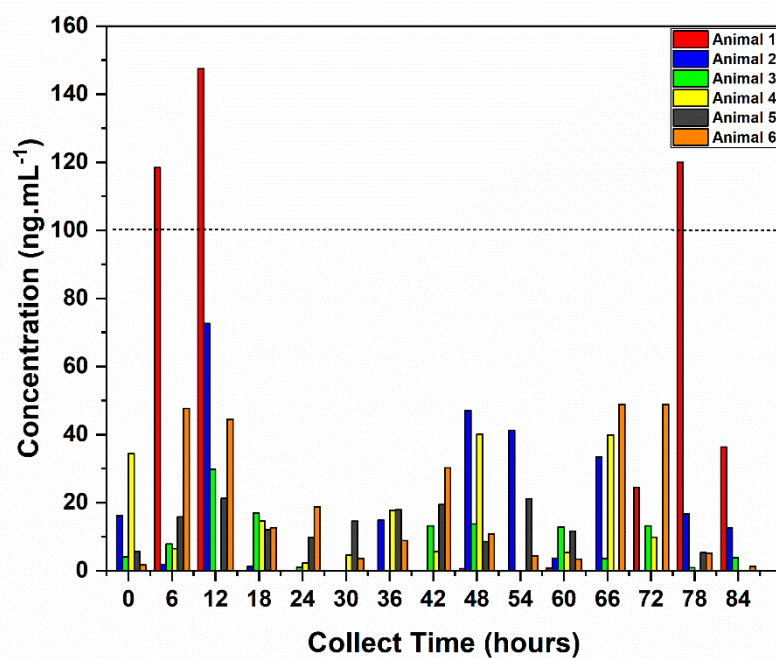


Figura 22. Concentração de CFT em amostras reais de leite bovino determinada via LC-MS/MS. A linha tracejada representa o valor LMR do antibiótico no leite.

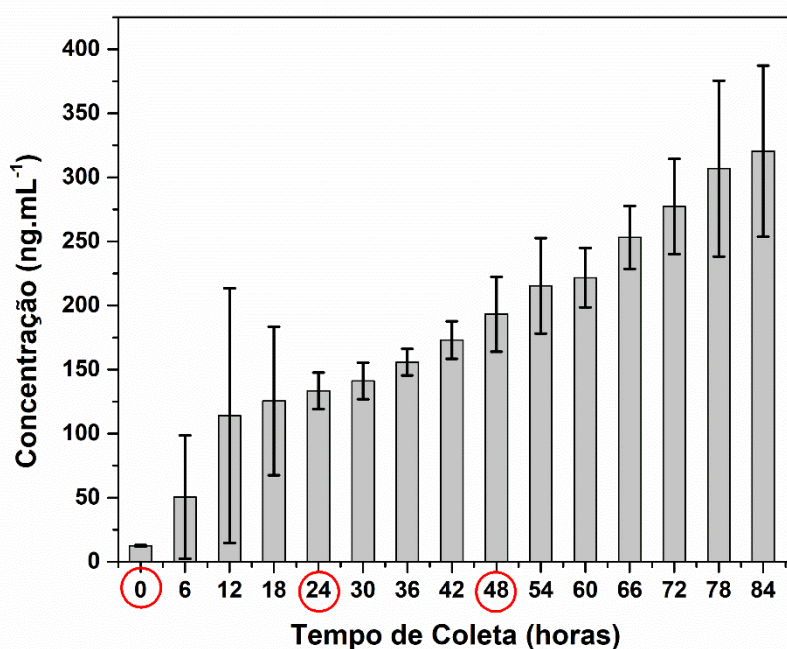


Figura 23. Concentração de CFT para 6 vacas submetidas à aplicação do medicamento durante 0, 24 e 48 h. Os círculos em vermelho correspondem ao momento da aplicação do antibiótico nas vacas.

A Figura 24 apresenta o percentual de acúmulo de CFT no leite bovino considerando o valor médio das 6 amostras de cada coleta em horários pré-determinados. Os valores de acumulação foram determinados pela diferença entre a concentração previamente determinada e os percentuais de concentração reais.

Considerando apenas o percentual de CFT por animal na Figura 24, pode-se observar que não há aumento significativo nos níveis de CFT após 12 horas, mesmo após a aplicação das outras duas doses do medicamento. As diferenças nos níveis de concentração para cada animal podem ser explicadas pelo metabolismo individual, idade dos animais, diferença no escore de condição corporal e nível de produção de leite.

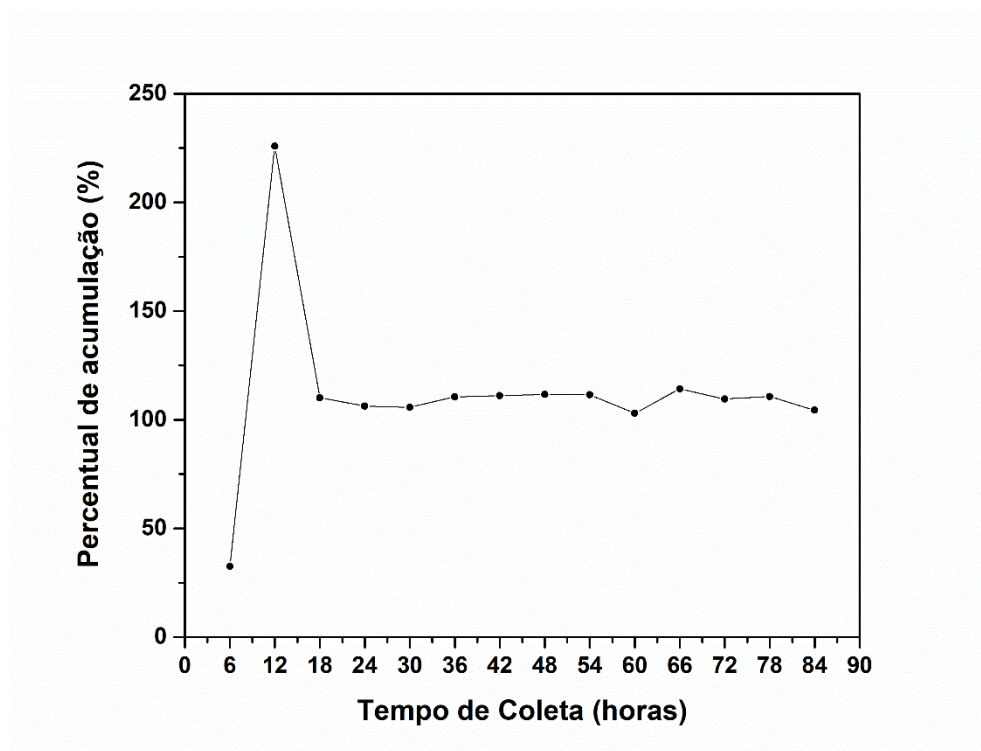


Figura 24. Percentual de acúmulo do CFT em leite bovino.

Os dados obtidos neste estudo indicam que o CFT é um medicamento que possui uma via metabólica diferente do leite (por exemplo, sangue e urina). Mesmo após 3 aplicações das dosagens recomendadas do medicamento, observa-se que a concentração aumenta em pequenas proporções. Após esse período, o incremento é de cerca de 10% para as horas restantes. Os resultados observados no presente estudo estão de acordo com a literatura. Gorden e colaboradores observaram que as taxas de resíduos de CFT aumentaram desde 2011 na produção leiteira. Os autores avaliaram a farmacocinética do CFT no plasma

sanguíneo em oito vacas saudáveis e oito vacas com mastite. Os animais receberam 2,2 mg de CFT/Kg peso corporal via intramuscular durante cinco dias. O sangue foi coletado em tempos pré-determinados e o plasma foi analisado via LC-MS. Com exceção do tempo zero, o CFT foi detectado em todas as outras amostras. As conclusões dos autores são: a eficácia do medicamento pode ser inferior ao esperado, os resíduos da droga podem aumentar nos tecidos dos animais ou no leite e isso pode levar a um aumento da resistência antimicrobiana (GORDEN et al., 2016). Han e colaboradores avaliaram a cinética de eliminação do CFT em vacas leiteiras em período de lactação. O perfil farmacocinético foi avaliado em nove vacas saudáveis e nove vacas infectadas por *Staphylococcus aureus*. Os autores apresentaram resultados de CFT detectado no leite até 108h após a última infusão do CFT no tratamento intramamário. Os autores concluíram que vacas com baixa produção de leite eliminam medicamentos de tratamento intramamário mais lentamente que vacas com maior produção. Os autores sugerem que o tratamento extra-rótulo do CFT seja evitado e recomendam o uso prudente do medicamento para o tratamento da mastite (HAN et al., 2017). Hajralui-Musliu e colaboradores desenvolveram e validaram um método LC-MS/MS para determinação simultânea de resíduos de 42 medicamentos veterinários (incluindo o CFT), 28 pesticidas e duas micotoxinas em urina bovina. Um total de 83 amostras de urina bovina foram coletadas em fazendas e testadas usando o método validado. Em apenas cinco amostras foram encontrados resíduos de medicamentos veterinários (metil e propiltiouracil). Não foram encontrados outros resíduos de medicamentos e contaminantes nas outras amostras analisadas (HAJRULAI-MUSLIU et al., 2023).

Embora os dados obtidos no presente estudo demonstrem que a concentração de CFT nas amostras de leite ficou abaixo do LMR em nenhuma amostra houve ausência do analito, o que vai contra a informação de carência zero informada na bula do medicamento. Os dados obtidos no presente estudo também revelam que a máxima concentração de CFT nas amostras de leite são obtidas em até 72h, podendo este ser um período de carência seguro como protocolo para o produtor.

5 - CONCLUSÃO

A Agenda 2030 preconiza alcançar a segurança alimentar e melhoria da nutrição da população mundial. Nesse sentido, o desenvolvimento de métodos de investigação de antibióticos em leite se faz necessário para o alcance de uma segurança alimentar no que tange a inocuidade do alimento.

Diante disso, um método de extração líquido-líquido foi adaptado para extração de ceftiofur em leite bovino. Após adaptação, o método foi submetido à avaliação da performance analítica, apresentando linearidade (aproximadamente 98%), baixos valores de LOD ($0,26 \text{ ng.mL}^{-1}$) e LOQ ($0,80 \text{ ng.mL}^{-1}$) e boa seletividade e sensibilidade demonstrando que o método analítico proposto pode ser empregado para análises de ceftiofur nessa matriz. As amostras foram analisadas por LC-MS/MS. Das 90 amostras reais analisadas apenas três delas apresentaram resultados acima do LMR, indicando que os leites avaliados estão adequados para o consumo, no que diz respeito a concentração do antibiótico no alimento, segundo a legislação nacional. O estudo também avaliou a administração do ceftiofur à seis vacas, as quais foram monitoradas quanto a depuração do antibiótico pelo leite em função do tempo. Segundo observado, após 72h não há mais a eliminação do antibiótico pelo leite. O metabolismo individual de cada animal pode atuar como fator de variação na concentração de CFT no leite ao longo do tempo.

Capítulo II:
**Determinação de bisfenóis (A e S) em leite longa vida
e suas respectivas embalagens por PSI-MS**

1.- FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A rápida deterioração do leite se expressa em função de sua composição específica, o que pode afetar sua qualidade e segurança. A redução na qualidade se deve a alguns fatores: exposição ao oxigênio e/ou luz, atividade microbiana e sorção de compostos em qualquer estágio do processamento, incluindo interações produto/embalagem que levam à deterioração do produto (GUETOUACHE et al., 2014; KONTOMINAS, 2019). A demanda mundial por leite de ultra-alta temperatura (UHT, *Ultra High Temperature*) aumentou devido à estabilidade do produto quando armazenado por um longo período de tempo (MALMGREN et al., 2017).

As embalagens cartonadas são a etapa final da fabricação do leite bovino. A embalagem desempenha um papel fundamental na indústria de alimentos e também na dieta das populações mundiais, uma vez que pode conter o produto e conservar os alimentos, mantendo a qualidade e segurança. Houve um aumento na ênfase dada aos problemas decorrentes da interação produto-embalagem (GEUEKE; GROH; MUNCKE, 2018).

Os bisfenóis representam um grupo de moléculas que estão presentes nas embalagens de alimentos e podem afetar a saúde dependendo do nível de exposição ao composto. Neste trabalho serão abordadas duas substâncias dessa classe de compostos: bisfenol A (BPA) e bisfenol S (BPS).

Devido às propriedades toxicológicas das moléculas de bisfenol, as autoridades legislativas mais respeitadas têm exigido enorme atenção ao potencial de migração desses compostos da embalagem para os alimentos.

A espectrometria de massas ambiente (AMS) tem sido uma técnica emergente exibindo um bom desempenho para a determinação de resíduos em matrizes alimentares. Essa técnica se popularizou na última década principalmente devido à menor necessidade de preparo de amostras, apresentando um desempenho de alto rendimento. Dentre as técnicas de AMS, destaca-se a espectrometria de massa de ionização por spray de papel (PSI-MS), técnica em que a amostra é depositada em um papel triangular seguido da aplicação de um solvente e uma alta voltagem para gerar gotículas carregadas da amostra a ser analisada por MS tornou-se popular por ser uma fonte de íons simples e de baixo custo (ZHANG; COOKS; OUYANG, 2012b; ZHANG; LIU; YA-JUN, 2014) e outros exemplos. No entanto, o PSI-MS nunca foi empregado para a análise de bisfenóis em leite e suas respectivas embalagens.

1.1 – A importância das embalagens cartonadas no envase do leite bovino

Em 1951, o economista e empresário Ruben Rausing, Suécia, idealizou a embalagem em formato de tetraedro. Três anos depois, as embalagens Tetra Pak começaram a acondicionar leite pasteurizado. Em 1961, surge a embalagem do tipo longa vida. Neste ano, o empreendedor, une os conceitos de ultra pasteurização e embalagem asséptica, criando a embalagem que protege o leite sem necessidade de conservantes e refrigeração (TETRA-PAK, 2021).

As embalagens cartonadas são produzidas com três materiais básicos: papel, polietileno e alumínio. A Figura 25 apresenta a estrutura da embalagem cartonada. Cada camada possui uma função: a primeira protege a camada de papel contra umidade exterior, a segunda tem função de sustentação e descrição do produto, a terceira tem a função de aderência, a quarta evita a passagem do oxigênio, luz e contaminação externos. A quinta representa outra camada de aderência e a última protege o produto e evita contato com as demais camadas (ECOLIFE TETRA-PAK, 2021).

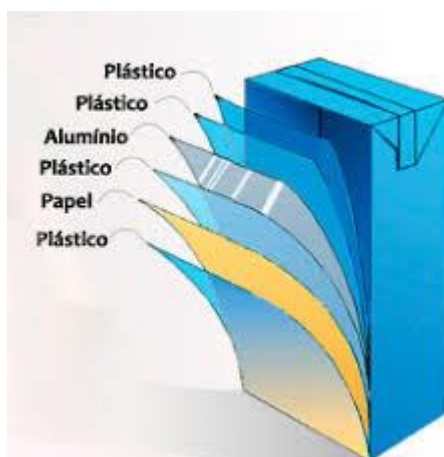


Figura 25. Estrutura da Embalagem Cartonada. Fonte: (ECOLIFE TETRA-PAK, 2021).

As embalagens do tipo longa-vida apresentam diversas vantagens, entre elas destacam-se: facilidade no transporte, segurança dos alimentos e sustentabilidade. Elas também ajudam a evitar que os alimentos tenham contato com microorganismos e outros agentes que podem causar desperdício. Atuam como barreira contra fatores responsáveis pela deterioração química, física e microbiológica (KARAMAN et al., 2015; KONTOMINAS, 2019; ZACARCHENCO; VAN DENDER; REGO, 2017).

1.2 – Interação embalagem com o alimento

Nos últimos anos problemas toxicológicos decorrentes da interação da embalagem com o alimento têm sido alvo de diversos estudos (MANSOUR, 2011). A migração para os alimentos de componentes plásticos, como monômeros, aditivos, corantes, tintas, vernizes, entre outros, pode afetar as propriedades organolépticas dos alimentos e produzir efeitos nocivos à saúde, se não forem devidamente controlados e se os níveis de concentração excederem os valores toxicológicos ou a legislação (WANG et al., 2021a). Muitos monômeros, plastificantes e aditivos são considerados desreguladores endócrinos, que interferem na produção, liberação, transporte, metabolismo, ligação ou eliminação de hormônios naturais, responsáveis por manter o equilíbrio e regulação dos processos de desenvolvimento (BLANCO-ZUBIAGUIRRE et al., 2020; FASANO et al., 2012; VILARINHO et al., 2019; WANG et al., 2021b). Dentre esses compostos podemos citar o grupo dos bisfenóis.

Os bisfenóis representam um grupo de moléculas normalmente encontradas em tintas e papéis, especialmente em papel reciclado. A literatura aponta que esses compostos são uma preocupação que precisa ser monitorada devido ao seu efeito toxicológico (BJÖRNSDOTTER; DE BOER; BALLESTEROS-GÓMEZ, 2017). Neste trabalho serão abordadas duas substâncias deste grupo de compostos: bisfenol A e bisfenol S.

O bisfenol A (BPA) (Figura 2), de massa monoisotópica igual a 228,1150 Da, é o análogo mais representativo do grupo dos bisfenóis (GARCÍA-CÓRCOLES et al., 2018) e tem sido associado a vários efeitos adversos à saúde, tais como: distúrbios reprodutivos, como diminuição do espermatozoides e efeitos na fertilidade (WANG et al., 2015a), neurotoxicidade (NAGAO et al., 2014), distúrbios do metabolismo (KIM et al., 2019), doenças cardiovasculares (HAN; HONG, 2016) e câncer (HUANG et al., 2012; WANG et al., 2015a).

O bisfenol S (BPS) (Figura 26), de massa monoisotópica igual a 250,0294 Da, também tem sido amplamente estudado e utilizado na indústria, apresentando atividade estrogênica com potencial toxicidade. Quando comparado ao BPA, o BPS apresenta maior resistência à biodegradabilidade. Com o uso generalizado do BPS como substituto do BPA em produtos de consumo nos últimos anos, a ocorrência de BPS em alimentos pode ser maior do que a do BPA, o que poderia representar uma séria ameaça à saúde humana (DUALDE et al., 2019b).

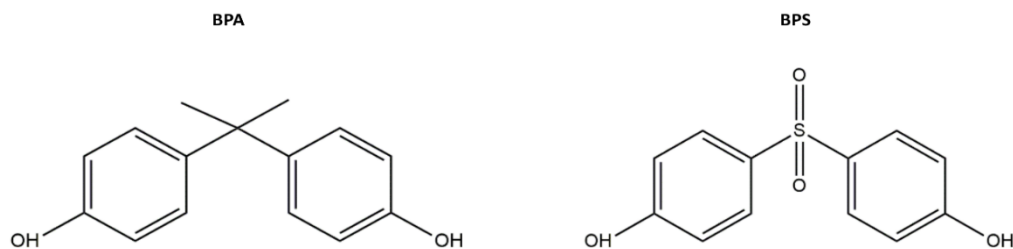


Figura 26. Estruturas químicas dos bisfenóis (A e S).

Devido às propriedades toxicológicas dos bisfenóis, as autoridades legislativas têm voltado atenção à potencial migração destes compostos das embalagens para os alimentos. Para mensurar essa quantidade faz-se uso do limite de migração específico (LME), ou *specific migration limit* (SML) é a quantidade máxima permitida de uma substância específica que pode migrar da embalagem ou recipiente para o alimento. O LME representa um limite de segurança derivado de estudos toxicológicos e sua medida é expressa em mg.Kg^{-1} de alimento (CHEMSAFETY PRO, 2018). De acordo com as Autoridades Europeias para a Segurança dos Alimentos, o BPA e o BPS têm um LME de $0,05 \text{ mg.Kg}^{-1}$ para alimentos (EFSA, 2020; EU, 2018). Os níveis de concentração permitidos são muito baixos e a matriz alimentar é geralmente complexa, dificultando a determinação do analito. Portanto, é urgente o desenvolvimento de métodos analíticos com alta sensibilidade e especificidade que sejam capazes de monitorar bisfenóis em alimentos. A cromatografia líquida (LC) e a cromatografia gasosa (GC) acopladas a um detector (MS, DAD, FLD e outros) são as mais utilizadas, mas requerem etapas extensas e trabalhosas de preparação da amostra antes da análise instrumental, consomem reagentes ou solventes e geram resíduos. Portanto, métodos analíticos que requerem preparação mínima de amostra e consomem menos reagentes e solventes são altamente desejáveis.

1.3 - Análise direta em espectrometria de massas

Os procedimentos em análise química, geralmente, são demorados e exigem pessoal qualificado. No entanto, técnicas rápidas e sensíveis são desenvolvidas e aprimoradas para eliminar ou diminuir as etapas de pré-processamento da amostra. Neste aspecto, a espectrometria de massas ambiente (AMS) apresenta técnicas (de dessorção e ionização de analitos) que são importantes para a análise direta em espectrometria de massas. Essas técnicas facilitam a triagem rápida de amostras com especificidade e sensibilidade adequadas

em comparação com GC-MS e LC-MS (CHEN et al., 2009; SAHA; MANDAL; HIRAOKA, 2013).

As análises de ionização ambiente permitem uma aquisição de dados rápida e simples. Essas técnicas operam sob os seguintes princípios: íons são gerados na pressão atmosférica e temperatura ambiente antes de entrar no espectrômetro de massas. As moléculas podem ser desorvidas/ionizadas diretamente da superfície da amostra, tornando possível a análise em tempo real (HSU; DORRESTEIN, 2015).

Em 2004, o grupo de pesquisa do Professor R. Graham Cooks da Universidade de Purdue, desenvolveu a técnica de ionização por eletrospray de desorção (DESI). Após a criação desta técnica, várias outras técnicas de AMS foram desenvolvidas. O AMS passou a ser amplamente utilizado e sua relevância pode ser notada por sua aplicação em diversas áreas, como o controle de qualidade de alimentos (ELLIS et al., 2012). Dentre as técnicas AMS, a ionização por *paper spray* (PSI) se tornou bastante útil e seu desempenho tem sido aplicado para diversos analitos e matrizes (JINGJING; JIE; XIAOLIN, 2013; MENDES et al., 2017b; WANG et al., 2010).

A técnica PSI foi desenvolvida pelos grupos do Dr. Graham Cooks e Dr. Zheng Ouyang como uma alternativa rápida, simples e confiável para a análise de matrizes complexas. O método consiste na aplicação de uma alta voltagem (2 a 5,5 kV) em um papel de formato triangular contendo a solução da amostra que pode ou não ser previamente tratada. Este papel está preso a uma garra metálica e fica a uma distância adequada da entrada do espectrômetro de massas. A amostra é aplicada no centro do substrato e posteriormente um solvente (contendo ácido ou base) é adicionado favorecendo a ionização. O solvente tem a capacidade de arrastar o analito por capilaridade até a extremidade do papel. Um *spray* eletrolítico (na forma de cone de Taylor) é formado na ponta do papel pela diferença da voltagem aplicada com a voltagem do capilar do espectrômetro de massas. O mecanismo de ionização é similar a técnica ESI. Os íons são formados em solução e o campo elétrico na ponta do papel induz a formação do spray com gotículas carregadas que são dessolvatadas e direcionados a entrada do equipamento (LIU et al., 2010). A Figura 27 apresenta um esquema geral do PSI.

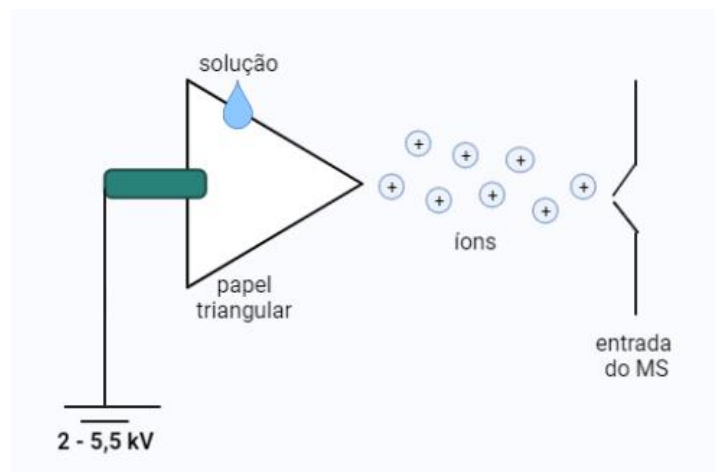


Figura 27. Esquema geral do método de ionização por PSI-MS.

Existem poucos trabalhos na literatura apresentando a aplicação da técnica de PSI em análise de alimentos.

A pesquisa de Meng e colaboradores apresenta uma identificação rápida de adulterantes ilícitos em alimentos. Foram obtidos baixos limites de detecção para cada matriz: 30 – 40 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de estimulantes sexuais (vardenafil, sildenafil) em licor medicinal, 20 – 50 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de corantes ilegais (Vermelho Sudão I, II, III e IV) em pimenta em pó e rodamina B em tempero para *hot pot*, 15 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de regulador de crescimento (forclorfernurão) em melancia. A análise foi realizada por ionização por nanoelectrospray capilar (nanoESI), PSI e ionização por spray de seringa (SSI) (MENG et al., 2020).

O trabalho de Moura e colaboradores apresenta um monitoramento de pesticidas (clorpirifós e ciazofamida) em casca de tomate durante os intervalos de pré-colheita utilizando o PSI. O limite de detecção foi de aproximadamente 0,01 mg.mL^{-1} (MOURA et al., 2020).

Basuri e colaboradores produziram um material superhidrofóbico para revestimento do papel cromatográfico para a análise de PSI. Os autores detectaram uma concentração de 1,2 ppt (10 pM) de melamina em amostras padrão (em água). Além disso, fizeram uma detecção qualitativa e quantitativa do analito em amostras de leite comercial (BASURI; BAIDYA; PRADEEP, 2019).

Su e colaboradores analisaram resíduos de nove antimicrobianos em diferentes matrizes alimentares via PSI-MS. As amostras foram colocadas diretamente no papel sem receber nenhum tipo de tratamento prévio. Os LODs obtidos foram: na carne de frango (15 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de marbofloxacina e difloxacina), na carne bovina (12,5 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de difloxacina e

lincomicina), no leite ($4 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ de amoxicilina e penicilina-G, $10 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ de cloxacilina) e no ovo ($12,5 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ de minociclina e $6,2 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ de cloretetraciclina) (SU; MA; OUYANG, 2018a).

Deng e colaboradores realizaram a microextração em fluxo lento (*slug-flow*) acoplada ao PSI-MS na determinação de fármacos em leite. Os LODs obtidos foram: 1 ng. mL^{-1} de eritromicina, $0,3 \text{ ng.mL}^{-1}$ de claritromicina, $0,2 \text{ ng.mL}^{-1}$ de roxitromicina (DENG et al., 2016).

Zhang e colaboradores analisaram melamina em leite (20 ng.mL^{-1}) por PSI-MS. Além dessa matriz, também determinaram fármacos em carne bovina e de porco, corantes (vermelho Sudão) em pimenta em pó e plastificantes em bebidas isotônicas (ZHANG; COOKS; OUYANG, 2012a).

Wang e colaboradores determinaram a presença de pesticidas em leite através da técnica de PSI-MS utilizando como substrato, papel cromatográfico não revestido em comparação com dois papéis revestidos com sílica (um obtido comercialmente e outro produzido no laboratório). O papel revestido (preparado no laboratório) apresentou melhor resposta para detecção dos analitos (alguns até 19 vezes mais eficiente que os outros papéis) (WANG et al., 2015b).

2. OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral

Determinar bisfenóis (A e S) em amostras de leite longa vida e suas respectivas embalagens cartonadas por meio da técnica PSI-MS.

2.2 – Objetivos Específicos

- Otimizar as condições PSI-MS para análises de bisfenóis em amostras de leite.
- Avaliar as figuras de mérito da metodologia PSI-MS desenvolvida para determinação de bisfenóis A e S em amostras de leite.
- Avaliar a presença de bisfenóis A e S nas embalagens longa-vida.
- Avaliar a presença de bisfenóis A e S em amostras de leite UHT obtidas comercialmente.

3 - METODOLOGIA

3.1 – Materiais e Reagentes

O solvente Metanol grau HPLC foi obtido da Tedia Company Ltda (Farfield, OH, USA). Hidróxido de amônio, BPA ($\geq 99\%$) e BPS ($\geq 98\%$) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Papel cromatográfico Whatman #1 (poros $11\mu\text{m}$) foi obtido da Whatman International Ltd. (Maidstone, Inglaterra).

3.2 – Amostras

Cinco embalagens cartonadas de leite UHT de diferentes marcas foram obtidos em mercado local e foram denominadas Amostras 1, 2, 3, 4, 5, independente da marca das embalagens ou do produtor de leite. Para avaliar a influência do tempo de estocagem, foram analisadas amostras do mesmo lote de fabricação de duas marcas diferentes (Amostras 6 e 7). Também foram avaliadas seis marcas diferentes de leite bovino UHT obtidos no mercado local.

3.3 - Aparato instrumental

Um espectrômetro de massas do tipo *ion trap* linear LTQ XL (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA) foi usado para análises PSI-MS, operando em modo negativo. Uma plataforma móvel tridimensional foi usada para controlar com precisão a localização da ponta de pulverização. Os seguintes parâmetros foram empregados nas análises: modo de ionização negativo; tempo de varredura: 0,30s; tensão da fonte: 4,00 kV; temperatura capilar: 250 ° C; tensão capilar: 10 V; lente do tubo: 50 V; energia de colisão: 32 eV; controle de ganho automático ativo (ACG); tempo máximo de injeção: 100 ms; microscans: 2. Os espectros de massa foram adquiridos em triplicata usando o software Thermo Tune Plus e foram processados usando o pacote de software Xcalibur Analysis (versão 2.2, Service Release 2, Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, EUA).

Um espectrômetro de massa Q Exactive Orbitrap de alta resolução (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) foi usado para confirmar e monitorar os analitos. Para estes experimentos, os seguintes parâmetros foram empregados: modo de ionização negativa (PSI); tensão de pulverização: 5000 V; temperatura capilar: 275 ° C; corrente máxima de pulverização: 50 µA; temperatura do aquecedor da sonda: 350 ° C; nível de RF da lente s: 50%.

3.4 – Otimização do PSI-MS

Antes de analisar os analitos diretamente nas embalagens cartonadas do leite UHT, foram realizados testes em papel cromatográfico. A primeira análise consiste em uma amostra em branco (apenas solvente), então o papel foi fortificado com BPA e BPS (2000 ng.mL⁻¹) e os testes de transição realizados aplicando o solvente após a adição dos analitos no papel. Os analitos foram monitorados por fragmentação (MS/MS) das moléculas de BPA e BPS no modo de operação de Monitoramento de Reação Seleccionada (SRM). Os íons monitorados para BPA e BPS foram os fragmentos *m/z* 212 e *m/z* 185, respectivamente.

3.5 - Análise direta por *paper spray* (embalagem e leite)

As amostras de embalagem foram cortadas em formatos triangulares de 1,5 cm de lado. Os papéis foram colocados na plataforma a uma distância média de 4 mm da entrada do espectrômetro de massa. Cinquenta microlitros de metanol básico (0,1 % NH₄OH) foram usados como solvente para pulverização na superfície da amostra. Para estimar a

concentração de BPA e BPS na caixa da embalagem, o papel triangular foi fortificado a concentrações de 1 e 10 ng.mL⁻¹. A Figura 28 apresenta: (a) o papel cromatográfico e a embalagem de leite cortados em formato triangular e (b) aparato instrumental do experimento do PSI-MS.

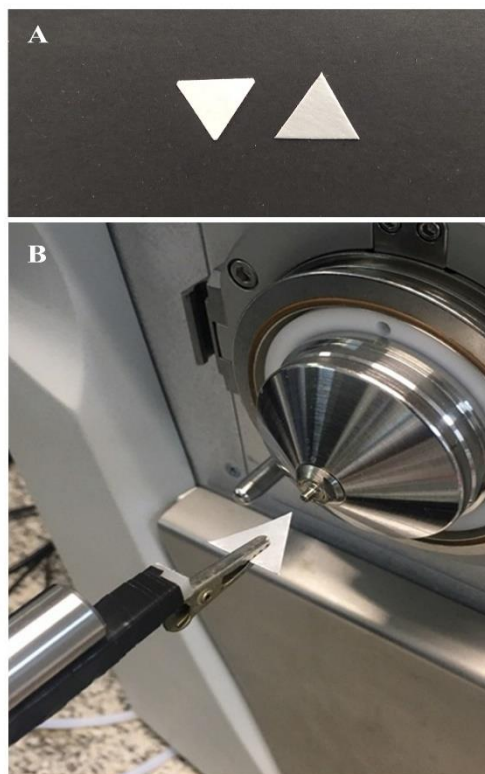


Figura 28. (a) Papel cromatográfico e embalagem de leite longa vida cortados em formato triangular e (b) Instrumentação para o experimento de PSI-MS.

3.6 - Determinação de BPA e BPS em amostras de leite

Amostras de 1 a 6 tiveram suas concentrações de BPA e BPS determinadas em amostras de leite por um procedimento prévio de extração líquido-líquido. Para isso, em um tubo de ensaio de vidro 1 mL de metanol alcalino frio foi misturado a 1 mL de amostra de leite. A mistura foi agitada usando um agitador de tubos (Vortex, Gehaka AV-1, São Paulo, Brasil) por 1 min e com centrifugação controlada por temperatura (15 °C, 5 min, 7000 rpm, centrífuga Sorvall Legend X1R, Thermo Scientific). O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo e analisado pela metodologia PSI-MS desenvolvida.

3.7 – Performance analítica

Para avaliar o desempenho analítico da técnica PSI em amostras de leite, foram construídas curvas de calibração utilizando soluções padrão de BPA e BPS variando de 50 a 500 ng.mL⁻¹; Todas as análises foram realizadas em triplicata. Não foi possível construir uma curva de calibração para as embalagens cartonadas, pois mesmo após lavagem exaustiva com solvente (MeOH) para remoção de todo analito presente na matriz o mesmo encontrava-se presentes nas amostras.

Para a determinação de BPA e BPS em amostras de leite foram avaliadas as seguintes figuras de mérito: limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), exatidão (erro relativo), precisão (desvio padrão relativo) e recuperação. Todas as equações estão descritas no Capítulo 1 (Seção 3.5).

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Otimização do método PSI-MS

Os experimentos iniciais com BPA e BPS foram realizados aplicando 50 µL de uma solução metanólica de 2000 ng.mL⁻¹ de cada composto em papel cromatográfico triangular e submetendo-os à análise de PSI-MS. Experimentos de MS/MS foram usados para melhorar a especificidade e sensibilidade química. A Figura 29 apresenta os espectros de MS/MS do modo de íon negativo com os íons de fragmento mais intensos para BPA e BPS. Os íons em *m/z* 212 e *m/z* 185 (BPA e BPS, respectivamente) foram monitorados em análises subsequentes devido às suas altas intensidades de sinal. A explicação para o mecanismo de fragmentação de ambos os bisfenóis já é conhecida e detalhada na literatura científica (ZHAO et al., 2016).

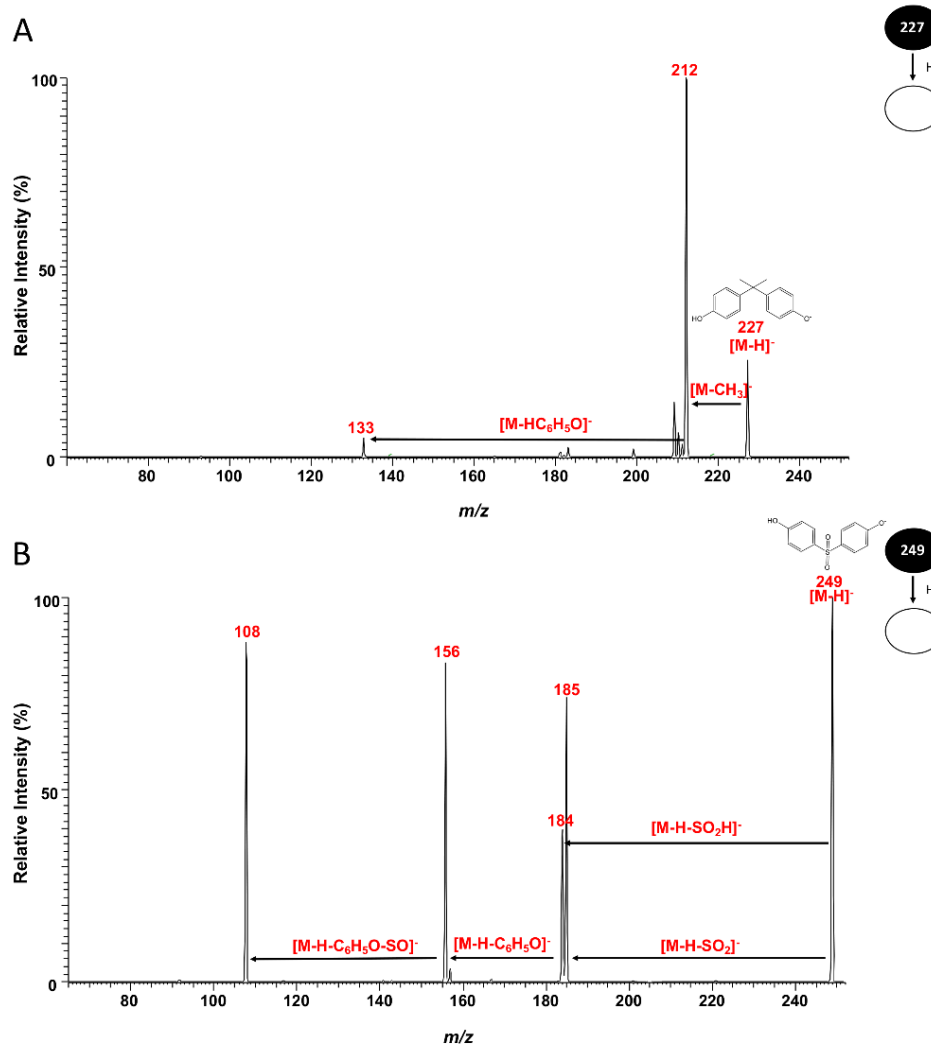


Figura 29. Espectros de fragmentação de (a) BPA e (b) BPS no modo negativo.

A Figura 30 mostra o cromatograma de íon total para uma análise PSI-MS/MS típica de bisfenóis, indicando que a aquisição de 30 s foi suficiente. Os experimentos de *carryover* foram realizados aplicando 50 μ L de metanol no papel após a primeira aquisição, e nenhum íon fragmento de BPA e BPS foi detectado. Assim, as análises subsequentes foram realizadas sem a necessidade de limpeza entre as análises.

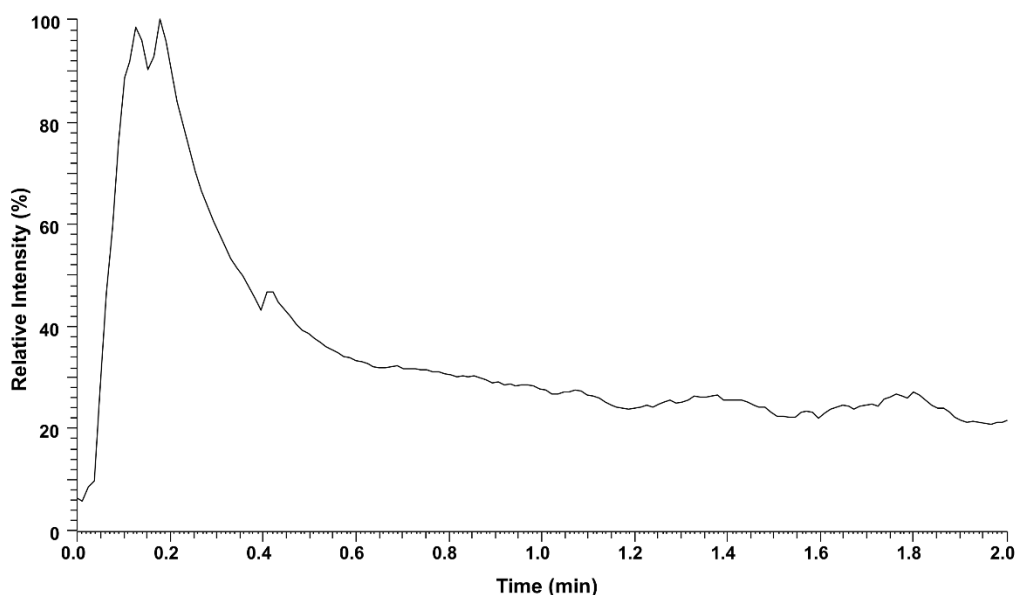


Figura 30. Cromatograma de íons totais obtidos para a técnica de PSI-MS/MS na análise dos bisfenóis ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em metanol.

4.2 - Análise PSI-MS das embalagens de leite

As embalagens de leite que não continham BPA e BPS foram enriquecidas com concentrações conhecidas (1 e 10 ng.mL^{-1}) de ambos os compostos para estimar seus níveis de concentração nas embalagens que continham os bisfenóis. Os resultados podem ser observados na Figura 31, que mostram as diferenças nas intensidades de BPA e BPS, respectivamente, obtidas a partir da análise de cinco embalagens de leite de diferentes marcas (Amostras 1 a 5) e também de outras amostras do mesmo lote (Amostras 6 e 7). A análise das embalagens de um mesmo lote foi realizada com o objetivo de evidenciar se havia diferenças significativas nas concentrações dos analitos entre as embalagens de leite da mesma marca. As embalagens de leite também foram analisadas por PSI-MS, usando um espectrômetro de massa de alta resolução, para confirmar as identidades dos compostos. O BPA foi detectado em m/z 227,10667 ($[\text{M-H}]^-$; erro = 0,786) e BPS em m/z 249,02259 ($[\text{M-H}]^-$; erro = 1,324).

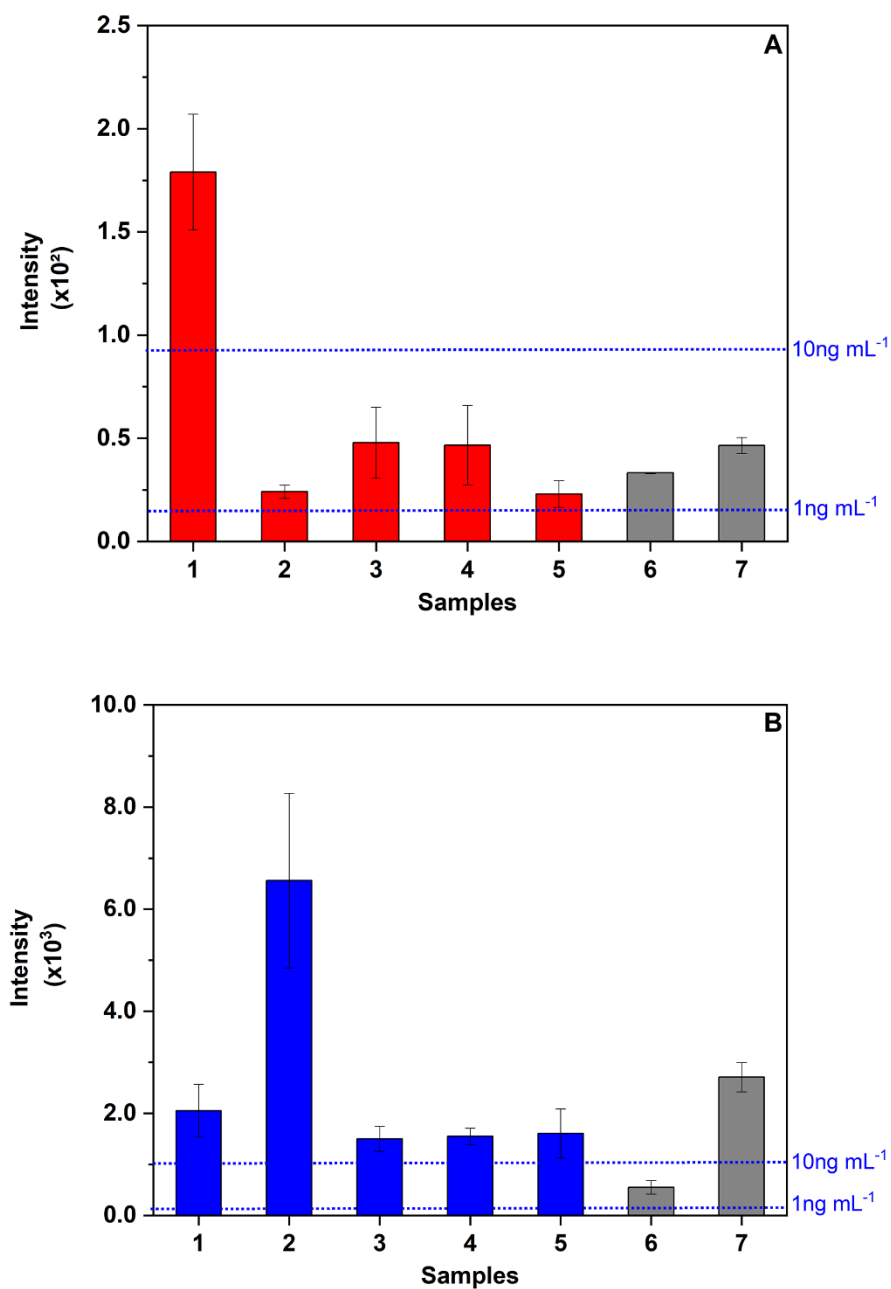


Figura 31. Intensidades de íons BPA (a) e BPS (b) obtidas para cinco variedades diferentes de embalagens de leite e do mesmo lote de fabricação de leite (Amostras 6 e 7). As linhas pontilhadas indicam as intensidades de íons obtidas com BPA e BPS a 1 ou 10 ng.mL⁻¹. Cada avaliação de amostra de caixa foi replicada (n = 5).

A concentração mais alta de BPA foi detectada na Amostra 1 (Figura 31a), e a intensidade mais alto de BPS foi detectado na Amostra 2 (Figura 31b). As amostras com os níveis mais baixos de BPA e BPS foram as de número 2 e 6, respectivamente. A concentração

de BPS em todas as embalagens de leite foi maior do que a de BPA, e algumas delas excederam os níveis de concentração recomendados (Amostra 2 para BPS e Amostra 5 para BPA), de acordo com o Regulamento da Comissão (UE) 2018/213 e publicação de apoio da EFSA 2020: Valores de regulamentação EN-1844 (EFSA, 2020; EU, 2018). As análises das embalagens do mesmo lote de leite mostraram Coeficientes de Variação para os níveis de BPA de 0,98% e 8,30% e para os níveis de BPS de 10,65% e 23,73% para as Amostras 6 e 7, respectivamente, em ambos os casos.

As embalagens cartonadas de leite bovino são produzidas com camadas de polietileno de baixa densidade (PEBD), papelão, PEBD, alumínio e PEBD. O papel cartão é produzido a partir de papéis compostos por fibras de celulose, virgens ou recicladas (KONTOMINAS, 2019). O material reciclado é o preferido, pois a reciclagem economiza matéria-prima e energia e reduz o desperdício. Papel e papelão reciclados podem conter muitos resíduos químicos indesejados do processo de reciclagem. Além disso, o processo de impressão em papel adiciona tintas, pigmentos, fotoiniciadores e plastificantes, etc. A produção usando papel e papelão reciclados é semelhante à usada para fibra virgem, mas requer etapas adicionais (GEUEKE; GROH; MUNCKE, 2018b). Devido à preocupação mundial com a concentração de bisfenol em alimentos e embalagens de alimentos, esse tema tem sido o foco de diversos estudos apresentados na literatura. A Tabela 11 apresenta alguns resultados da literatura científica, mostrando diferentes metodologias para a determinação de BPA e BPS em embalagens de alimentos.

Tabela 11. Resultados da literatura sobre a determinação de BPA e BPS em embalagens de alimentos.

Analito	Matriz	Análise	LOD/LOQ ou concentração estimada	Referência
BPA	Materiais descartáveis plásticos	UPLC-TOF-MS	LOD: 0,027–0,030 $\mu\text{g.L}^{-1}$	(LIAN et al., 2020)
BPA	Material de embalagem de papelão	LC-QqQ	LOD: 4 ng.g^{-1}	(BLANCO-ZUBIAGUIRRE et al., 2020)
BPA e BPS	Plástico de contato com alimentos	LC-DAD e outros detectores	LOQ: 0,05 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para ambos	(WANG et al., 2019a)
BPA	Embalagem plástica de comida para bebê	GC-MS/MS	LOQ: 0,1–1,2 ng.g^{-1}	(GARCÍA-CÓRCOLES et al., 2018)
BPA	Comida enlatada	GC-LRMS	LOQ: 0,20 ng.g^{-1} (comida) LOQ: 20 ng.L^{-1} (líquidos)	(LORBER et al., 2015)
BPA	Comida embalada	LC-FLD	LOD: 0,1 ng.mL^{-1} (laranja) LOD: 0,3 ng.mL^{-1} (leite)	(XU et al., 2011)

BPA		Embalagem para produtos de água e bebidas	GC-MS	0.022–0,030 ng.g ⁻¹ (garrafa PET)	(CAO; POPOVIC, 2018)
BPA e BPS	e	Caixas para embalagem de leite bovino	PSI-MS	0.0585–0,32 ng.g ⁻¹ (lata) LOD>1 ng.mL ⁻¹ (BPA) LOD>10 ng.mL ⁻¹ (BPS)	Presente trabalho

Como pode ser visto na Tabela 11, limites inferiores da metodologia de detecção foram atingidos, especialmente para o BPA. A Tabela 11 também apresenta um estudo de Wang e colaboradores (WANG et al., 2019a), de que o teor de BPS em embalagens plásticas de alimentos apresenta um LOQ superior aos encontrados no presente estudo, utilizando um sistema de detecção menos sensível.

4.3 - Determinação de BPA e BPS em amostras de leite

Para avaliar o teor de BPA e BPS das embalagens cartonadas e do leite bovino, após o pré-tratamento descrito na seção experimental o extrato lácteo obtido foi analisado por PSI-MS utilizando papel cromatográfico como substrato. A Figura 32 apresenta as curvas analíticas obtidas para BPA e BPS em amostras de leite bovino usando papel cromatográfico como substrato.

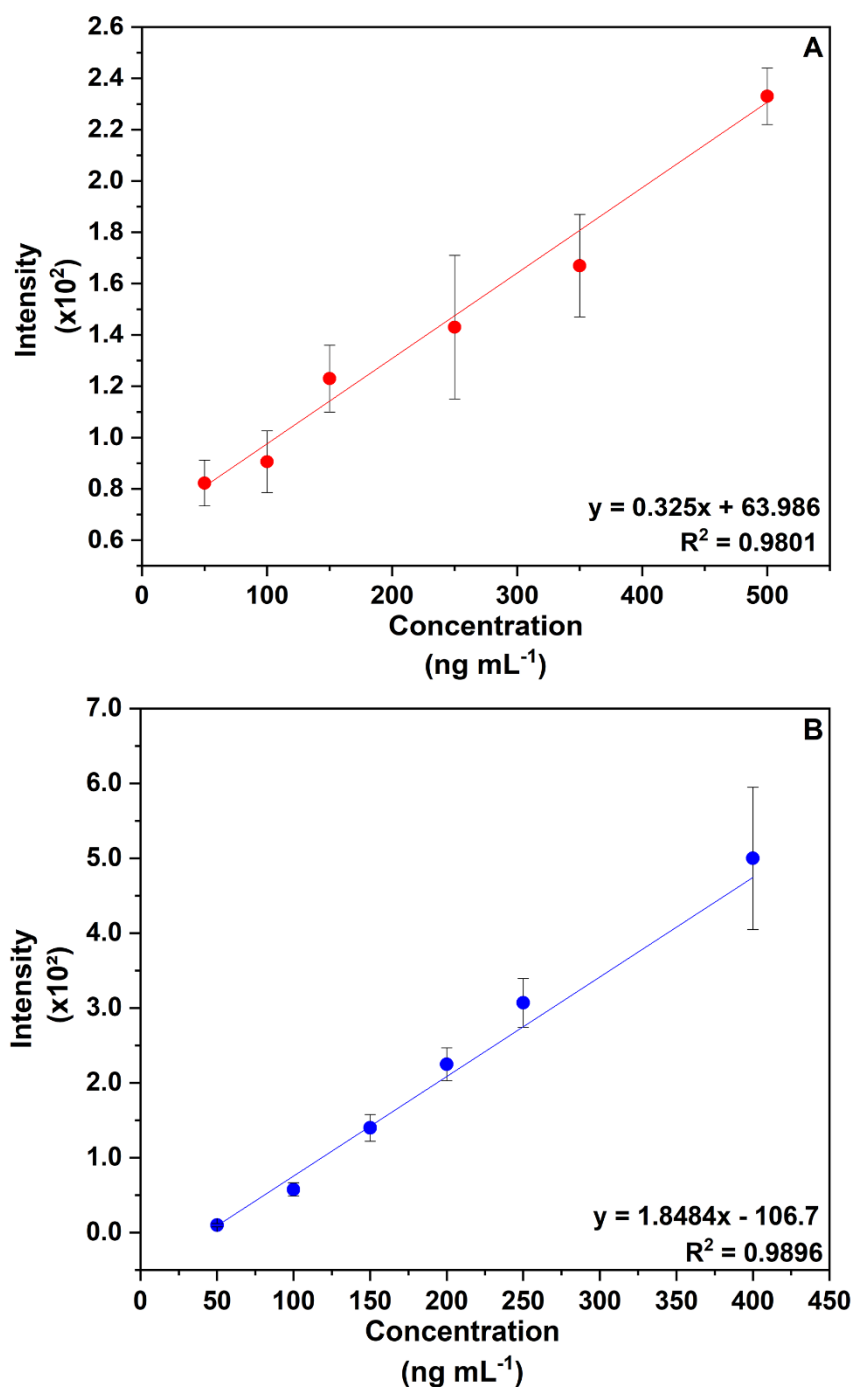


Figura 32. Curvas analíticas para (a) BPA e (b) BPS.

A metodologia desenvolvida apresentou linearidade na faixa de concentração de 4,8 (LOQ) a 500,0 ng mL^{-1} para BPA e 16,0 (LOQ) a 400,0 ng mL^{-1} para BPS com $R^2 > 0,98$, e todas as concentrações foram avaliadas nos ensaios replicados ($n=5$), apresentando

coeficiente de variação (CV) <20% conforme solicitado pelos órgãos reguladores. O pré-tratamento da amostra, neste caso, foi necessário devido à complexidade da matriz (leite), o que dificulta a aquisição dos dados de MS e também pode resultar em danos ao equipamento. Além disso, a baixíssima concentração dos analitos e a possibilidade de serem suprimidos pelos sinais dos compostos da matriz tornaram essencial o pré-tratamento da amostra. No entanto, esse procedimento foi mínimo, com consumo de solvente e tempo de preparo reduzidos. Em comparação com SPE (GRUMETTO et al., 2013) ou QueChers (DUALDE et al., 2019a), a metodologia de precipitação utilizada aqui foi rápida e também forneceu limpeza da amostra adequada para análise direta, evitando a necessidade dos requisitos de HPLC comumente usados em análises de leite.

Para maior confiança do método, algumas figuras de mérito foram avaliadas como: linearidade do método, LOD, LOQ, precisão, exatidão e recuperação. Exatidão, precisão (RSD) e recuperação foram avaliadas em três níveis de concentração em ensaios replicados (n=5). Essas figuras de mérito para o método PSI-MS são mostradas na Tabela 2. Os ensaios foram realizados usando concentrações de controle de qualidade BPA e BPS de 75,0, 175,0 e 375,0 ng.mL⁻¹.

Conforme demonstrado na Tabela 12, a recuperação obtida variou de 89 a 112% para a metodologia desenvolvida. Mais uma vez é necessário enfatizar que a metodologia desenvolvida permitiu a determinação da contaminação por BPA e BPS em amostras de leite, com precisão e exatidão em um menor tempo de análise com mínimo consumo de reagente.

A metodologia apresentou valores de CV (ou RSD) de 5,9–14,8%, (de acordo com as agências reguladoras brasileiras, que recomendam um RSD de <20%), indicando boa acurácia e precisão da metodologia desenvolvida. A precisão pode ser expressa como a recuperação percentual do analito de concentração conhecida adicionado à amostra. (ANVISA, 2017).

Tabela 12. Figuras de mérito obtidas pela metodologia PSI-MS para análise de BPA e BPS em amostras de leite UHT.

Analito	Concentração Teórica (ng mL ⁻¹)	Concentração Experimental (ng mL ⁻¹)	SD ^a (%)	CV ^b (%)	Recuperação (%)
Intra-day (n = 5)	75,0	66,9	10,6	15,8	89
	175,0	163,1	16,4	10,1	93

		375,0	366,2	31,1	8,5	98
BPA	Inter-day (n = 3)	75,0	75,4	14,3	18,9	100
		175,0	159,5	16,9	10,6	91
		375,0	401,4	34,6	8,6	107
BPS	Intra-day (n = 5)	75,0	84,0	11,1	13,2	112
		175,0	155,8	9,2	5,9	89
	Inter-day (n = 3)	375,0	312,9	29,7	9,5	89
		75,0	80,3	10,6	13,2	107
		175,0	143,3	15,0	10,5	82
		375,0	278,8	22,2	8,0	74

A Tabela 13 sumariza alguns resultados da literatura para a determinação de BPA em amostras de leite bovino. Até o presente momento, não há estudos relatando contaminação BPS de leite bovino UHT ou de embalagens cartonadas de leite. A concentração de BPS foi estudada e determinada em amostras de leite humano, indicando um LOQ de BPS no leite humano de 0,25 ng.mL⁻¹ (DUALDE et al., 2019a).

Tabela 13. Níveis de concentração de BPA no leite em diferentes embalagens de acordo com a literatura.

Matriz	LOD	Análise	Embalagem	Referência
Leite de vaca	NQ–0,059 ng.g ⁻¹ 1*	UHPLC-QqQ	Embalagem variadas	(HERRERO et al., 2021)
Leite e leite em pó	0,01µg.kg ⁻¹	HPLC-FLD	Produtos engarrafados	(LV et al., 2014)
Leite em pó	0,005 mg.kg ⁻¹	LC-MS/MS	-	(FERRER et al., 2011)
Leite integral	0,20–0,66 µg.L ⁻¹	HPLC-FLD	-	(DING et al., 2019)
Leite	0,75–2,5 µg.L ⁻¹	HPLC-UV	-	(FILIPPOU; DELIYANNI; SAMANIDOU, 2017)
Leite	0,3 ng.mL ⁻¹	HPLC-FLD	Leite enlatado	(XU et al., 2011b)

*Peso fresco

Como pode ser visto na Tabela 13, os estudos da literatura indicam baixos valores de LOD na determinação do BPA em amostras de leite. No entanto, o presente estudo obteve valor de LOD semelhante usando uma metodologia de análise direta, sem pré-tratamento exaustivo da amostra e relativamente rápido em comparação com as metodologias LC-MS em outros estudos. As metodologias de PSI-MS vêm chamando atenção pela simplicidade, rapidez e possibilidade de serem realizadas no local de atendimento, dada a popularidade dos equipamentos portáteis de MS. Portanto, a metodologia apresentada aqui pode ser uma ferramenta poderosa no futuro para agências regulatórias que monitoram contaminantes como BPA e BPS em amostras de leite.

Para demonstrar a eficiência do método, algumas amostras de leite comercialmente disponíveis em um mercado local foram analisadas. A Figura 33 apresenta as concentrações de BPA e BPS obtidas em amostras comerciais de leite UHT. Na Amostra 6, não foi possível detectar a presença de BPA; isso pode ser atribuído à concentração do contaminante estar abaixo da concentração de LOD.

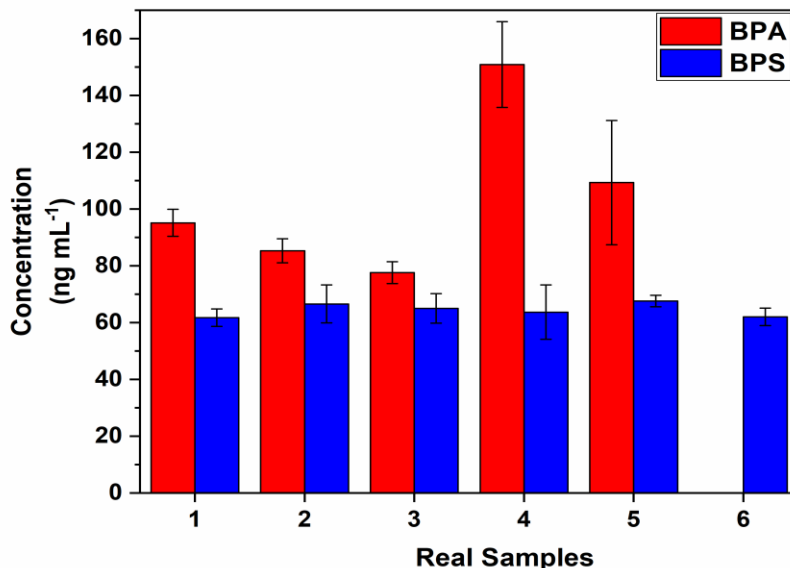


Figura 33. Concentrações obtidas de BPA e BPS em amostras de leite longa vida.

Todas as amostras analisadas exibiram uma concentração média de aproximadamente 60,0 ng.mL⁻¹ para BPS e valores na faixa de 77,6-150,8 ng.mL⁻¹ para BPA. Na literatura existem poucos estudos explorando produtos químicos que migram de alimentos para

embalagens de alimentos (LESTIDO-CARDAMA et al., 2022). Os métodos para a determinação simultânea de BPA e BPS em leite UHT não são triviais e os relatos na literatura são escassos. Existem alguns estudos relatados na literatura que avaliaram a migração de compostos desreguladores endócrinos em alimentos (BLANCO-ZUBIAGUIRRE et al., 2020; LIAO; KANNAN, 2013, 2014; VILARINHO et al., 2019; WANG et al., 2019b, 2021a). No entanto, poucos estudos enfocaram a presença de bisfenóis no leite bovino UHT (DING et al., 2019; FILIPPOU; DELIYANNI; SAMANIDOU, 2017; YANG et al., 2018). Até o presente momento, não há estudos que considerem a análise de BPS em embalagens cartonadas de leite UHT. Nesse sentido, este estudo representa um avanço no monitoramento dessas substâncias e na mitigação da exposição dos consumidores de leite bovino UHT. Isso é necessário, visto que o BPS tem sido usado como substituto do BPA pela indústria (LIAO; KANNAN, 2014), o que pode resultar em uma preocupação mundial em relação à contaminação do leite em um futuro próximo.

Herrero e colaboradores avaliaram a presença de quatro ftalatos sete parabenos e BPA em 42 produtos lácteos. Onze marcas diferentes mostraram resultados positivos para BPA, ftalatos e parabenos em cinco tipos de embalagens diferentes: embalagens metalizadas de alumínio, papel cartonado, polietileno de alta densidade, latas metálicas e polietileno tereftalato (PET). Os analitos foram determinados por UPLC-QqQ sendo que o BPA foi o que apresentou menor concentração ($8,3 \text{ pg.g}^{-1}$ de peso fresco) quando comparados aos outros compostos. (HERRERO et al., 2021). Outro estudo determinou traços de bisfenóis no leite (BPA, BPB, BPAP, BPAF) usando extração de fase sólida dispersiva assistida por reação efervescente (mETDSE/Ni@N-GrTs) e HPLC com detecção de fluorescência (DING et al., 2019).

Cinco bisfenóis (BPA, BPB, BPF, BPFGE, BPADGE) em leite embalado em garrafas plásticas e caixas foram avaliados por Grumetto e colegas de trabalho. Este estudo usou SPE para pré-tratamento de amostra e análise por HPLC com detecção de fluorescência. O preparo da amostra foi realizado com 10 mL de leite, adição de 10 mL de MeOH e posterior sonicação. A mistura foi diluída para 100 mL com água desionizada e carregada em um cartucho SPE C18 previamente condicionado com 5 mL de ACN e equilibrado com 5 mL de água. O cartucho carregado foi lavado com 20 mL de $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ (80:20, v/v) e seco durante 15 min sob vácuo e fluxo de nitrogênio (3 min). Os analitos foram eluídos com 5 mL de ACN e analisados por LC-FLD. Os autores analisaram o BPA, obtendo um intervalo linear de 10–600 (ng.mL^{-1}) com R^2

= 0,9963, LOD = 2,5 ng. mL⁻¹ e LOQ = 8 ng. mL⁻¹. De acordo com os autores, de nas 68 amostras analisadas, o BPA foi detectado em 16 (10–481 ng.mL⁻¹) (GRUMETTO et al., 2013).

O estudo de Lestido-Cardama e colaboradores a quantificação de ftalatos e benzofenonas migrados da embalagem do leite bovino e embalagens de produtos lácteos para o alimento. Os autores identificaram a composição do material de embalagem através da espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) com refletância total atenuada (ATR) e microscopia Raman confocal. A preparação e extração da amostra foram realizadas pela adição de concentrações conhecidas de padrões a 1 g de amostra liofilizada e repouso por 15 min. Para a extração, foram utilizados 10 mL de solução de ACN/DCM (50:50, v/v) e 1 mL de ácido acético glacial, seguido de agitação manual (15 min) e centrifugação. O sobrenadante foi removido e armazenado a -30 °C por 24 h. A emulsão foi quebrada pela adição de NaCl e agitação vigorosa. Alíquotas de 10 mL foram retiradas e evaporadas sob corrente de nitrogênio, seguido da adição de 1 mL de ACN e 500 µL do padrão interno, microfiltração e análise por GC-MS. Para os sete analitos estudados, eles obtiveram valores de R² de 0,9900–0,9984, LODs de <0,005–0,05 µg.g⁻¹ e LOQs de 0,005–0,1 µg.g⁻¹. Os dados sugeriram baixa exposição alimentar aos contaminantes avaliados (ftalatos e benzofenonas), mas os autores consideraram que a exposição combinada a vários produtos químicos e os efeitos sinérgicos podem representar riscos à saúde humana (LESTIDO-CARDAMA et al., 2020).

Outros estudos envolvendo a detecção da presença de bisfenóis em diferentes matrizes são relatados na literatura, como por exemplo no leite materno (DUALDE et al., 2019a, 2019b), comida para bebês (GARCÍA-CÓRCOLES et al., 2018), amostras de água (torneira, enlatada, engarrafada, com gás, mineral, entre outros) (BEMRAH et al., 2014), frango, porco e camarão (LI et al., 2018b), 37 alimentos e bebidas embalados (grãos e derivados, leite e derivados, carne e derivados, peixe, margarina e manteiga, frutas e vegetais, comida pronta, lanches, bebidas variadas, temperos) (SAKHI et al., 2014), ração para gado (WANG et al., 2021a), alimentos (267 amostras de diferentes alimentos – bebidas, manteiga e margarina, peixes e frutos do mar, cereais e derivados, carne e derivados, frutas e vegetais enlatados) (LIAO; KANNAN, 2013), embalagens de papel e papelão diversas (caixas de pizza, caixa para comida quente, prato de papelão, formas de cupcake e papel manteiga) (BLANCO-ZUBIAGUIRRE et al., 2020) e a avaliação de seis bisfenóis em plásticos de contato com alimentos (WANG et al., 2019b).

As possíveis fontes de materiais com alto teor de BPA em produtos de origem animal ainda são amplamente desconhecidas. A contaminação pode ocorrer em várias etapas do processo: coleta, processamento dos alimentos ou na própria embalagem. Em termos de tempo de contato com o alimento, as embalagens (papéis térmicos ou papelão reciclado) são a fonte mais provável. Alimentos também podem ser contaminados pelo depósito de partículas suspensas no ar durante cada uma das fases de processamento (BEMRAH et al., 2014).

A metodologia desenvolvida foi aplicada à avaliação de BPA e BPS em diferentes marcas de leite (amostras reais) do mercado local em Goiânia, Goiás, Brasil. Analisando a Figura 33, é possível indicar que os contaminantes estão presentes na maioria das amostras em níveis acima das concentrações permitidas pela legislação em vigor. É importante enfatizar que a legislação para BPA e BPS têm valores de LME de $0,05 \text{ mg.kg}^{-1}$ de alimento. A amostra 4 (BPA) apresentou concentrações três vezes maiores que o limite permitido pelos órgãos reguladores. Os dados coletados neste estudo são socialmente importantes, pois confirmam a qualidade do leite comercializado no mercado brasileiro em termos de incidência de BPA e BPS, e o método desenvolvido pode apoiar os órgãos reguladores.

Conforme mostrado neste trabalho, o PSI-MS é uma técnica útil para analisar BPA e BPS em leite e embalagens de leite. As características fáceis de usar e menos exigentes do PSI-MS proporcionam rápida determinação de bisfenóis em amostras, o que tradicionalmente é realizado por técnicas mais complexas, caras e exigentes, como a cromatografia acoplada a um detector. Não é sugerido aqui que o PSI-MS substitua os métodos convencionais de cromatografia para quantificação absoluta de bisfenóis em leite e embalagens de leite, mas espera-se que a triagem preliminar seja facilitada utilizando um método mais rápido e simples.

5 - CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou ser possível estimar os níveis de BPA e BPS em diferentes amostras de embalagens de leite UHT, como também quantificar ambos os analitos em leite pela técnica de PSI-MS. As concentrações do BPS superaram as do BPA nas embalagens cartonadas, enquanto nas amostras de leite o BPA apresentou concentrações mais elevadas. Das sete amostras de embalagens analisadas, todas apresentaram a presença dos contaminantes mesmo em baixas concentrações. Das seis amostras de leite analisadas, todas apresentaram contaminação por bisfenóis, exceto a Amostra 6, que não apresentou a presença de BPA. As concentrações de BPS em amostras reais de leite mostraram valores

muito semelhantes. Todas as amostras apresentaram níveis acima dos limites estabelecidos pela legislação. Este trabalho é o primeiro a demonstrar as concentrações de BPA e BPS em embalagens e leite UHT utilizando a técnica PSI-MS. Considerando a necessidade urgente de desenvolver novos métodos analíticos para a análise de bisfenóis, este trabalho mostra que estes compostos nocivos podem ser facilmente detectados e quantificados através de um método simples e barato, com potencial para ser uma alternativa aos métodos cromatográficos convencionais.

Capítulo III:

Desenvolvimento de método miniaturizado (HF-LPME) para extração de herbicidas em amostras de arroz por análise direta (ESI-MS)

1 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 – Produção de arroz no Brasil

O arroz (*Oriza sativa*) representa o produto agrícola de maior importância em âmbito global. É o alimento básico de metade da população mundial e representa 20% da ingestão diária dos seres humanos. Atualmente, os cereais como arroz, milho e trigo são produzidos 2,5 bilhões de toneladas e em 2050 a previsão é que a produção aumente para 3,3 bilhões de toneladas (OMENA et al., 2019).

O Brasil representa o maior produtor de arroz da América Latina e é destaque na produção mundial. A produção anual representa uma média de 10 milhões de toneladas, podendo variar de acordo com as condições climáticas em cada ano (EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO, 2019). Na safra 2022/2023, de acordo com a Conab (Companhia Nacional de Abastecimento), o país já produziu 10.033,3 mil toneladas de arroz total (sequeiro e irrigado) em uma área de 1.479,6 mil hectares (CONAB, 2023).

O crescimento no consumo do arroz ocasionou um consequente aumento do uso de agrotóxicos para melhorar seu rendimento de produção. Atualmente é feito o uso de herbicidas, inseticidas e fungicidas pós-emergência durante várias etapas do cultivo. O uso desses compostos afeta todo o sistema produtivo: solo, água e grãos de arroz (PAREJA et al., 2011a).

1.2 – Agrotóxicos

Os agrotóxicos são produtos químicos utilizados na agricultura para proteger as plantações contra pragas, doenças ou ervas daninhas que podem prejudicar a produtividade e qualidade do cultivo (MOURA et al., 2020). Os compostos são denominados pesticidas, herbicidas, fungicidas, entre outros. Podem ser aplicados diretamente nas plantas, no solo ou na água para matar ou inibir o crescimento de organismos que prejudicam a produção agrícola (PERES; MOREIRA; ORGS., 2003). O uso de agrotóxicos deve ser regulamentado e controlado para garantir a segurança alimentar e a proteção do meio ambiente (ANVISA, s.d). Ainda que traga grandes benefícios em suas aplicações, o mal uso destes compostos podem se acumular no meio ambiente, causando malefícios a longo prazo (LUCAS et al., [s.d.]; MEENA et al., 2020).

Dentre os agrotóxicos comercializados, os herbicidas compreendem um conjunto de substâncias químicas utilizadas para controlar ou matar plantas indesejadas, conhecidas

como ervas daninhas. Os herbicidas são amplamente utilizados na agricultura, silvicultura, controle de vegetação em áreas urbanas e outras aplicações para garantir a saúde e produtividade das culturas (ROMAN et al., 2007).

Os herbicidas clomazone, imazapir e imazapic são produtos químicos utilizados na agricultura como forma de manter o controle de ervas daninhas. Os problemas decorrentes da utilização destes agroquímicos na agricultura são: a contaminação ambiental contribuindo para poluição atmosférica, poluição da água e contraminação dos solos, além do surgimento de ervas resistentes (BERNASCONI et al., 2021; CHEN et al., 2021; MARQUES et al., 2021; MONQUERO et al., 2008). A Tabela 14 apresenta algumas informações dos compostos citados. A Figura 34 apresenta as estruturas químicas dos herbicidas citados.

Tabela 14. Informações dos herbicidas clomazone, imazapir, imazapic.

Herbicida	Formula Molecular	Massa Molar (g.mol ⁻¹)	pKa		
			1	2	3
Clomazone	C ₁₂ H ₁₄ ClNO ₂	239,70	-	-	-
Imazapir	C ₁₃ H ₁₅ N ₃ O ₃	261,28	1,90	3,60	11,0
Imazapic	C ₁₄ H ₁₇ N ₃ O ₃	275,30	2,00	3,60	11,1

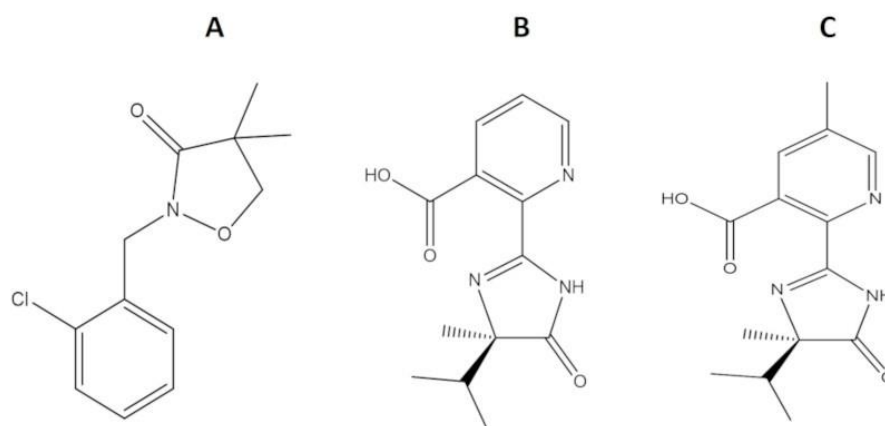


Figura 34. Estruturas químicas do (a) clomazone, (b) imazapir e (c) imazapic.

O clomazone é um herbicida da classe das isoxazolidinonas que atua como inibidor da síntese de carotenoides nas plantas. Ele interfere na etapa inicial da formação de carotenoides, resultando em danos às plantas sensíveis. O clomazone é absorvido

principalmente pelas raízes e plântulas das plantas alvo e, em menor medida, por suas folhas (EPA, 2007).

Tanto o imazapir quanto o imazapic são herbicidas da classe das imidazolinonas que atuam inibindo a enzima acetolactato sintase (ALS), também conhecida como enzima acetohidroxiácido sintase (AHAS), nas plantas sensíveis. Essa enzima é responsável pela síntese de aminoácidos essenciais. Os herbicidas são absorvidos pelas folhas e raízes das plantas-alvo e translocados através do xilema para os meristemas de crescimento, onde inibem a produção de aminoácidos. Isso leva à interrupção do crescimento celular e, eventualmente, à morte das plantas sensíveis (KRAEMER et al., 2009).

Por ser um dos maiores produtores de alimentos do mundo, o Brasil necessita de grande utilização destes defensivos para suprir a demanda de produção e consumo. A má utilização destes compostos em grandes lavouras e sua acumulação nos solos e outras matrizes representam um grande problema para saúde humana e meio ambiente. Neste aspecto, é de importante necessidade o uso de técnicas analíticas altamente sensíveis para a determinação de resíduos de agrotóxicos em matrizes complexas, tais como solos, alimentos, entre outras (VARGAS MEDINA et al., 2021).

1.3 – Técnicas miniaturizadas de preparo de amostras

As técnicas miniaturizadas de preparo de amostra vão de encontro aos preceitos da Química Analítica Verde, abrangendo procedimentos que contribuam para reduzir o uso de solventes e quantidades de resíduos gerados após cada análise, bem como a redução do uso de energia, redução do tempo gasto nas análises, além de menor exposição ocupacional do analista a vapores tóxicos (KORANY et al., 2017; KUROWSKA-SUSDORF et al., 2019; MARTINS et al., 2021).

As técnicas miniaturizadas podem ser de fase sólida ou líquida. As de fase sólida amplamente utilizadas são: Microextração em fase sólida (SPME, *Solid Phase Microextraction*) em três modos de extração que podem ser utilizados modo direto, *headspace* e *in-tube*, Extração sortiva em barra de agitação (SBSE, *Stir Bar Sorptive Extraction*), Microextração por fase sólida baseada em agitação dispersiva (D-SPE, *Dispersive Solid-Phase Extraction*), Microextração em sorvente empacotado (MEPS, *Microextraction by packed sorbent*) (LUIZ; MACIEL; LANÇAS, 2015).

Entre as técnicas de fase líquida mais utilizadas destacam-se: Microextração em fase líquida (LPME, *Liquid Phase Microextraction*), Microextração Líquido-líquido dispersiva (DLLME, *Dispersive liquid-liquid Microextracion*), Microextração em gota suspensa (SDME, *Single drop Microextraction*) e a microgota pode ser imersa dentro da fase doadora (DI-SDME, *direct imersion*) ou suspensa no *headspace* (HS-SDME) e Microextração líquido-líquido suportada em fibra oca (HF-LPME, *Hollow fiber liquid phase Microextraction*). Cada técnica tem suas vantagens e aplicações específicas, e a escolha depende do tipo de amostra, dos analitos de interesse e das necessidades analíticas (LUIZ; MACIEL; LANÇAS, 2015).

1.3.1 – Microextração em fase líquida (LPME) e Microextração em fase líquida suportada com fibra oca (HF-LPME)

O princípio da técnica utiliza microlitros de um solvente imiscível em água (fase extratora) para extrair os analitos de interesse de uma matriz aquosa (fase doadora). Uma vantagem é a diminuição na quantidade de solvente orgânico utilizado para fazer a extração quando comparada a LLE. O pequeno volume de fase extratora utilizado em relação ao volume da amostra favorece altos fatores de enriquecimento (OLIVEIRA et al., 2008). Atualmente, existem três modos de LPME: SDME, DLLME, HF-LPME (MERIB; CARASEK, 2013a).

No desenvolvimento de métodos de análise de contaminantes utilizando a LPME alguns parâmetros devem ser otimizados. O solvente orgânico representa o critério de maior importância na técnica. Este deve ser de alta pureza, pouco volátil e ter alto ponto de ebulição. No caso de se utilizar um solvente volátil ou com baixo ponto de ebulição, a sua evaporação causaria alterações nas concentrações dos analitos avaliadas nos experimentos. O solvente deve ainda ser imiscível na fase aquosa (KOKOSA, 2019). Outros parâmetros são agitação da amostra, volume do solvente, adição de sal, alteração do pH (MERIB; CARASEK, 2013a).

Na técnica HF-LPME, a fibra oca representa uma membrana porosa mais usualmente feita de polipropileno. Os poros da fibra são impregnados com o solvente orgânico de extração e o lúmen (interior oco) é preenchido com a fase aceptora. As microseringas são conectadas às extremidades da membrana para introdução e retirada da fase aceptora. Isto faz com que a fase aceptora não entre em contato direto com a matriz aquosa (fase doadora), permitindo agitação durante a extração. Cada unidade de extração é utilizada uma única vez, evitando

contaminação entre análises, fato que é conveniente pelo baixo custo do material (OLIVEIRA et al., 2008; RAMOS PAYÁN et al., 2010).

As vantagens do uso da fibra oca no preparo de amostra é que a técnica utiliza membranas descartáveis e volumes reduzidos de solvente orgânico. Os volumes de amostra variam de acordo com os comprimentos da fibra. Outro aspecto importante da técnica é o elevado fator de enriquecimento que indica uma extração ocorrendo em mililitros de uma fase doadora para microlitros de uma fase aceptora (DIONÍSIO et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2008; RAMOS PAYÁN et al., 2010).

A técnica de HF-LPME pode ser utilizada de dois modos diferentes: bifásico e trifásico. No modo de duas fases, o solvente hidrofóbico (fase extratora) é imobilizado nos poros da fibra oca e também preenche o lúmen (fase aceptora). O sistema é colocado em contato com a amostra aquosa (fase doadora) contendo o analito. Como o extrato obtido é orgânico de característica hidrofóbica, a fase aceptora pode ser analisada de forma direta com a etapa de secagem do solvente e reconstituição em fase apropriada (OLIVEIRA et al., 2008; RAMOS PAYÁN et al., 2010). No modo de três fases a solução presente no lúmen é aquosa. Neste aspecto, o pH da fase doadora é ajustado para que o analito permaneça na forma molecular permitindo que seja extraído por difusão passiva pelo solvente orgânico presente nos poros. O pH da fase aceptora deve ser ajustado de forma com que o analito esteja ionizado impossibilitando o retorno do analito para a fase doadora (VILLAR-NAVARRO et al., 2013).

Existem duas configurações principais para HF-LPME: configuração em "U", que utiliza duas microseringas conectadas à fibra (mais empregada) e, configuração tipo "haste" ("*rod-like*"), onde somente uma microseringa é utilizada para injetar e coletar a fase aceptora. Estas configurações estão destacadas na Figura 35.

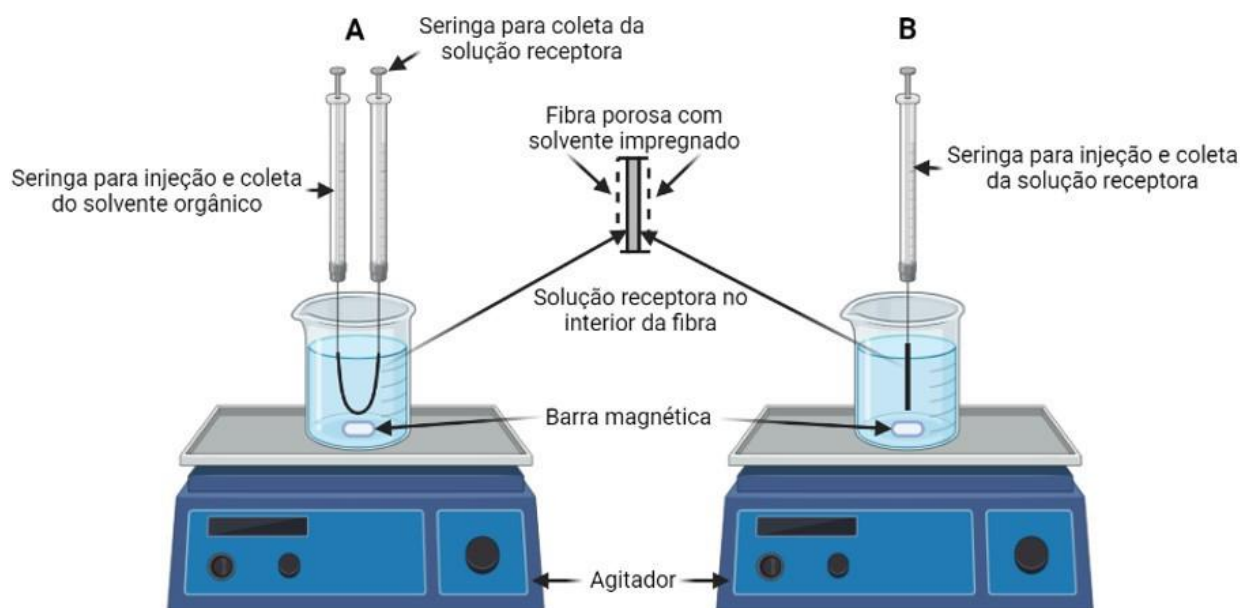


Figura 35. Representação esquemática da HF-LPME do tipo "U" (A) e do tipo "haste" (B). (OLIVEIRA et al., 2008) – Adaptado.

A proposta do projeto é utilizar a técnica HF-LPME na extração dos analitos das matrizes (alimentos). A Figura 36 apresenta os dois modos de extração em HF-LPME.

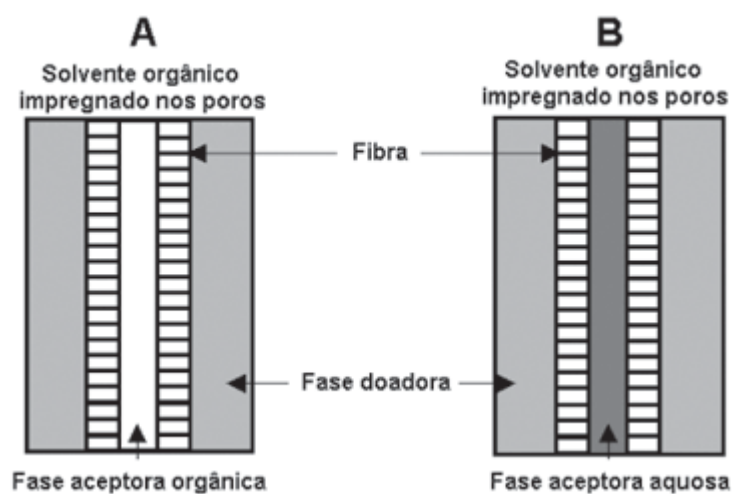


Figura 36. Extração em HF-LPME: sistema bifásico (A) e sistema trifásico (B) (OLIVEIRA et al., 2008).

2 - OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral

Avaliar o desempenho da micro extração em fase líquida por fibra oca na determinação dos herbicidas imazapic, imazapir e clomazone por espectrometria de massas (ESI-MS).

2.2 – Objetivos Específicos

Otimizar os parâmetros de extração: tempo de agitação, comprimento da fibra, fase aceptora, pH da fase doadora e adição de sal;

Desenvolver um método adequado para a determinação de herbicidas via ESI-MS.

Avaliar a performance analítica baseado nas figuras de mérito: linearidade, LOD, LOQ, exatidão, precisão e recuperação.

3 - METODOLOGIA

3.1 – Padrões e Reagentes Analíticos

O solvente metanol grau HPLC foi obtido da Tedia Company Ltda (Farfield, OH, EUA). Ácido fórmico, 1-Decanol foram obtidos de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, Estados Unidos). 1-octanol, hidróxido de sódio, cloreto de sódio foram obtidos da Synth (Diadema, SP, Brasil).

3.2 – Materiais usados para HF-LPME

A membrana de fibra oca de polipropileno Accurel Q 3/2 utilizada para microextração em fase líquida foi adquirida da Membrana GmbH (Wuppertal, Alemanha). O diâmetro interno era de 600 µm, a espessura da parede era de 200 µm e o tamanho dos poros era de 0,2 µm. Duas microseringas de vidro, 10 µL (Hamilton, Bonaduz, Suíça) modelo 1701RNR (comprimento: 5,1 cm, od: 0,071 cm e id: 0,015 cm), uma utilizada para introduzir a fase aceitadora na fibra e a outra utilizada como suporte. Um agitador magnético (IKA C-MAG.HS 7) com garra presa a uma haste de suporte universal foi utilizado para agitação da amostra.

3.3 – Aparato instrumental

Todas as análises foram realizadas em Espectrômetro de Massas linear do tipo *ion trap* linear 2D LTQ XL (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA). Foram realizados testes para

melhorar detecção dos analitos na concentração de 1000 ng.mL⁻¹. Os analitos foram avaliados via infusão direta no modo ESI(+) utilizando metanol acidificado (ácido fórmico, 0,1%) e os parâmetros otimizados são: modo *fullscan*, Tempo de scan: 1 minuto; Voltagem da fonte: 4,00 kV; Temperatura do capilar: 275 °C. Todas as amostras foram injetadas em triplicata. Os espectros de massa foram adquiridos em triplicata usando o software Thermo Tune Plus e foram processados usando o pacote de software Xcalibur Analysis (versão 2.2, Service Release 2, Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, EUA).

Um espectrômetro de massas do tipo *ion trap* linear LTQ XLTM (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA) foi usado para análises ESI-MS, operando em modo positivo. Parâmetros: tempo de aquisição: 0,60s; tensão da fonte: 4,00 kV; temperatura capilar: 250°C; tensão capilar: 10 V; lente do tubo: 50 V; energia de colisão: 32 eV; controle de ganho automático ativo (ACG); tempo máximo de injeção: 100 ms; microscans: 3. Os experimentos foram realizados em modo *fullscan*.

3.4 – Otimização do método HF-LPME

3.4.1 - Linearidade

Para avaliar o desempenho analítico dos experimentos de HF-LPME dos herbicidas por detecção via ESI-MS foram obtidas curvas analíticas para cada analito. A faixa de concentração foi de: 1, 30, 60, 90, 120 e 150 ng.mL⁻¹. A curva foi construída pela intensidade dos picos obtidos para cada íon. Essa calibração será utilizada em experimentos futuros.

3.4.2 – Planejamento Fatorial 2³

Os experimentos de HF-LPME foram realizados, inicialmente, através do sistema bifásico. Foi elaborado um planejamento fatorial 2³ para avaliar as melhores condições para realizar a microextração em fase líquida por fibra oca. O objetivo da análise foi extrair herbicidas com o máximo rendimento em soluções aquosas na concentração de 1000 ng.mL⁻¹.

A Tabela 15 apresenta os níveis inferior e superior (- e +, respectivamente) e os fatores avaliados: tempo de agitação (10 e 30 minutos), comprimento da fibra (8 e 12 cm) e solvente de extração (octanol e decanol). Os resultados dos experimentos foram obtidos na forma de rendimento (%) baseado na intensidade dos picos dos herbicidas: clomazone (*m/z* 240),

imazapir (m/z 262) e imazapic (m/z 276).

Tabela 15. Planejamento fatorial para experimentos de HF-LPME para análise de herbicidas.

Experimento	Tempo de agitação (minutos)	Comprimento da fibra (cm)	Fase aceptora (Solvente de extração)
1	(-) 10	(-) 8	(-) Octanol
2	(+) 30	(-) 8	(-) Octanol
3	(-) 10	(+) 12	(-) Octanol
4	(+) 30	(+) 12	(-) Octanol
5	(-) 10	(-) 8	(+) Decanol
6	(+) 30	(-) 8	(+) Decanol
7	(-) 10	(+) 12	(+) Decanol
8	(+) 30	(+) 12	(+) Decanol

3.4.3 - Procedimento para HF-LPME

As extrações consistiram na preparação de 15 mL de solução aquosa fortificada com os herbicidas na concentração de 1000 ng.mL^{-1} , a qual foi transferida para um béquer. Com auxílio de um par de microseringas (Hamilton), inseriu-se $100 \mu\text{L}$ da fase aceptora (orgânica) na fibra. As microseringas foram colocadas em suporte universal presas a uma garra metálica em posição para que a fibra apresentasse um formato em “U”. A fibra foi imersa no béquer contendo a solução doadora (aquosa) e o sistema permaneceu em constante agitação em agitador magnético (IKA C-MAG.HS 7) em tempo pré-determinado pelo planejamento fatorial. Ao término do período de agitação, a amostra foi aspirada com uma das microseringas e este conteúdo dispensado em um eppendorf. O tubo é levado para secagem por 30 minutos em equipamento do tipo Speed Vac (Savant SPD131DDA SpeedVac concentrator). Após a secagem completa, a amostra é ressuspensa em $500 \mu\text{L}$ de MeOH e analisada via ESI-MS. As injeções foram realizadas em triplicata. A Figura 37 representa o sistema de extração.



Figura 37. Sistema de extração bifásico.

3.5 – Testes adicionais

Foram realizados testes adicionais para avaliar quais outros parâmetros poderiam influenciar na extração dos herbicidas via HF-LPME. Os testes adicionais são descritos a seguir.

3.5.1 - Teste variação de concentração no LMR

As legislações afirmam que o Estudo de Resíduo deve ser conduzido com o agrotóxico para estabelecer ou confirmar o Limite Máximo de Resíduos (LMR) de seus ingredientes ativos (ANVISA, 2023). A Tabela 3 apresenta as concentrações dos herbicidas para análise: -1/2 LMR, LMR e +1/2 LMR. Esses três testes foram realizados utilizando os melhores parâmetros de rendimento obtidos através do planejamento experimental para a extração em solução aquosa.

Tabela 16. Valores de concentrações para teste de LMR.

ANALITO	Teste A (-1/2 LMR) (ng.mL ⁻¹)	Teste B (LMR) (ng.mL ⁻¹)	Teste C (+1/2 LMR) (ng.mL ⁻¹)
Clomazone	5	10	20
Imazapir	25	50	100
Imazapic	25	50	100

3.5.2 - Teste do pH e Força Iônica

Foram realizados quatro extrações para avaliar a influência do pH e a adição de sal (cloreto de sódio, NaCl, Synth) nas extrações. As soluções foram ajustadas nos pH's desejados utilizando HCl (1 mol.L⁻¹) e NaOH (1 mol.L⁻¹) em pHmetro (PG1800 ,Gehaka) e também pela adição ou não de NaCl à solução. Todas as extrações foram realizadas utilizando os melhores parâmetros obtidos no planejamento fatorial. A Figura 2 representa as condições para o experimento.

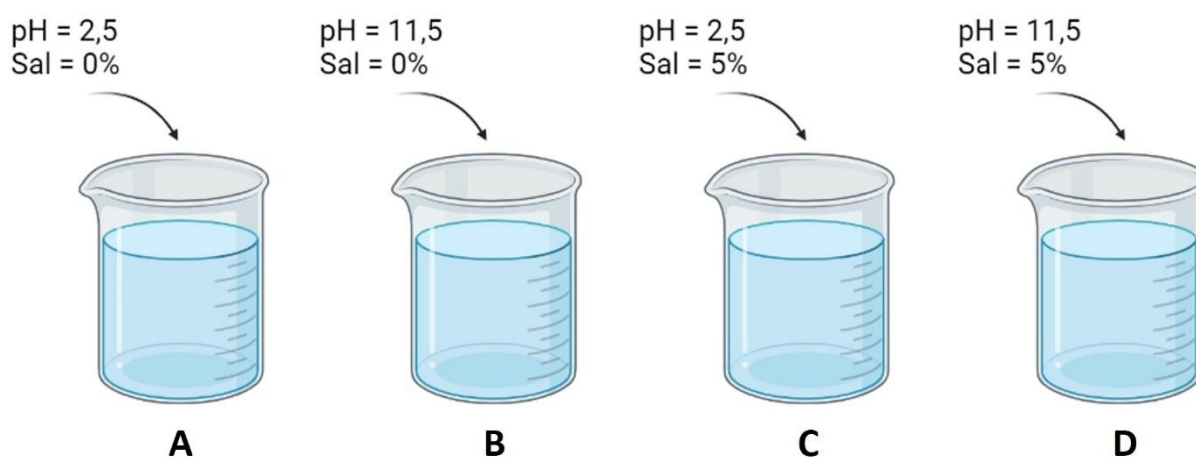


Figura 38. Condições do experimento de adição de sal.

3.5.3 - Teste do Sistema Trifásico

Foram realizados três experimentos para avaliar se o sistema trifásico é mais eficiente que o sistema bifásico. Neste sistema, a fibra foi impregnada com octanol e a fase aceptora utilizada foi água com pH 12 ajustado em pHmetro (PG1800 ,Gehaka). Os testes tiveram os pH's da fase doadora ajustados com HCl 6 mol.L⁻¹ e HCl 1 mol.L⁻¹, conforme mostra a Tabela 17.

Tabela 17. Valores de pH's da fase doadora.

Teste 1	Teste 2	Teste 3
pH = 1,7	pH = 2,5	pH = Sem alteração (próximo à 6,0)

O sistema trifásico (Figura 39) é composto da mesma forma que o sistema bifásico, diferenciando apenas nas fases do sistema. A fase doadora que é composta pela solução aquosa contendo os analitos, a fase presente nos poros da fibra, na qual o solvente utilizado foi o octanol e a fase aceptora que é composta por solução aquosa. Neste caso a água foi utilizada como fase aceptora, necessitando de um pH maior que o pKa do analito, sendo esta, a fase que receberá os analitos de interesse.

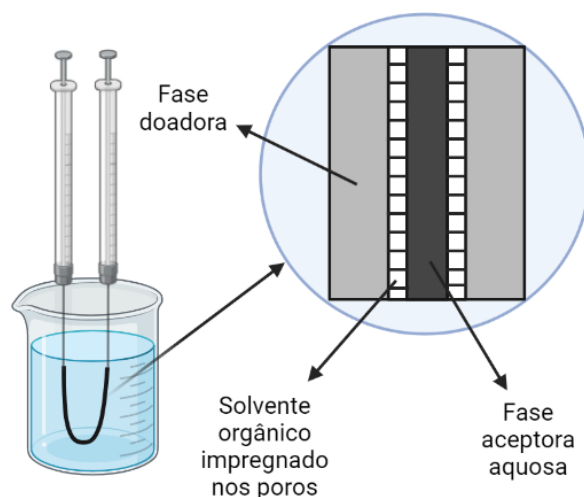


Figura 39. Sistema trifásico.

3.6 – Novo Planejamento Fatorial para octanol e decanol

Foram testadas as variáveis tempo e tamanho da fibra utilizando os dois solventes separadamente, logo são 11 experimentos para cada solvente, totalizando 22 experimentos. As extrações foram realizadas inicialmente com octanol e posteriormente com o decanol. A Tabela 18 apresenta os valores dos níveis para este experimento. A Tabela 19 apresenta o planejamento fatorial realizado para cada solvente. Foi utilizada a concentração de 1000 ng.mL⁻¹ para estes experimentos.

Tabela 18. Parâmetros avaliados no novo planejamento fatorial.

Variáveis	Níveis				
	-1.41421	-1	0	1	1.41421
Tempo de extração (min)	6	10	20	30	34
Comprimento da fibra (cm)	7	8	10	12	13

Tabela 19. Novo planejamento Fatorial realizado para octanol e decanol separadamente.

Ensaio	Tempo de extração (min)	Comprimento da fibra (cm)
1	10	8
2	30	8
3	10	12
4	30	12
5	6	10
6	34	10
7	20	7
8	20	13
9	20	10
10	20	10
11	20	10

3.7 – Sistema trifásico utilizando decanol

Foram realizados experimentos univariados para verificar a melhor resposta avaliando alguns parâmetros como adição de sal e agitação. Neste sistema, a fibra foi impregnada com decanol e a fase aceptora utilizada foi água com pH 12 com NaOH (2 mol.L^{-1}) e a fase doadora ajustada a pH 1,7 com HCl (2 mol.L^{-1}) medido em pHmetro (PG1800 ,Gehaka). O tempo de extração foi de 30 minutos e o comprimento da fibra foi 12 cm. A Tabela 8 apresenta as condições de cada experimento. As amostras foram analisadas em triplicata na concentração do LMR para cada analito.

Tabela 20. Condições dos experimentos HF-LPME utilizando decanol.

Experimento	Condição
1	Sem adição de sal, com agitação, 20° C
2	Com adição de sal, com agitação, 20° C
3	Sem adição de sal, sem agitação, 20° C
4	Sem adição de sal, com agitação, 40 °C

3.8 – Sistema trifásico otimizado

Foi realizado um único experimento utilizando: tempo de agitação (10 minutos), comprimento da fibra (8 cm), sem adição de sal, pH da fase doadora = 1,7 e pH da fase aceptora = 12, octanol como fase orgânica que preenche o lúmen. Este teste foi realizado para comparar com a melhor resposta do Teste do Sistema Trifásico (Seção 4.5.3). Os analitos foram extraídos na concentração do LMR.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Parâmetros para análise de espectrometria de massas

Os parâmetros do MS foram ajustados para avaliar todos os resultados obtidos nos experimentos. A Figura 40 apresenta o espectro de massas *fullscan* (modo ESI+) indicando a presença dos herbicidas (clomazone, imazapir e imazapic) na concentração de 1000 ng.mL⁻¹ para cada analito.

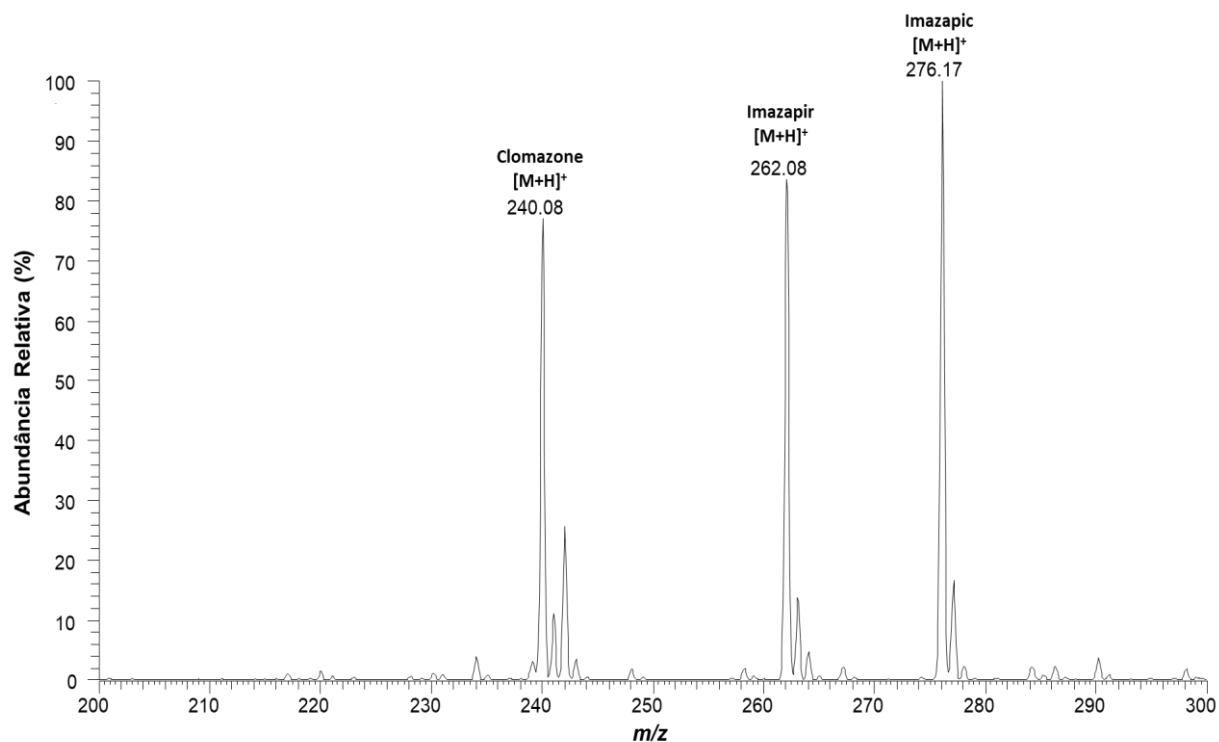
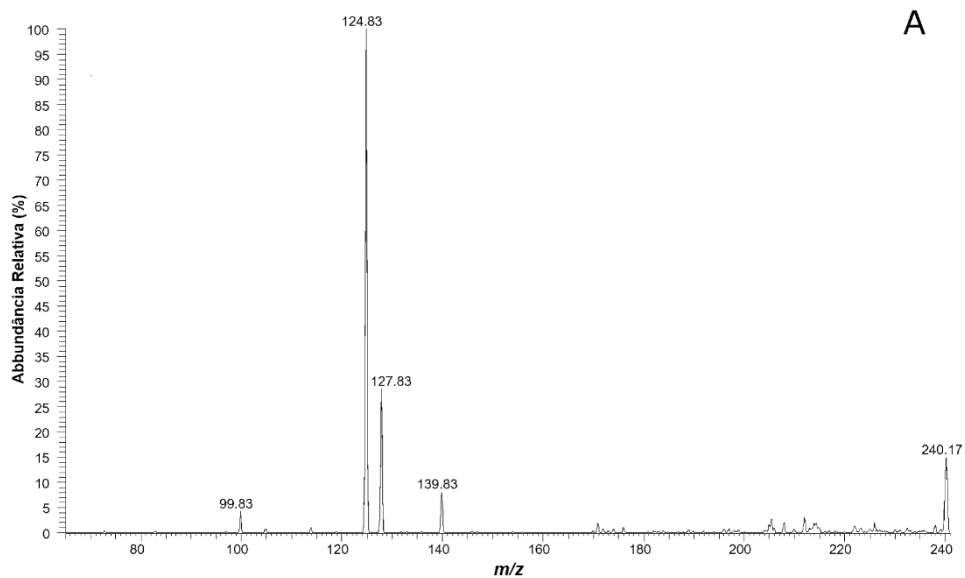


Figura 40. Espectro de massas *fullscan* para os herbicidas clomazone, imazapir e imazapic respectivamente obtido em equipamento do tipo *ion trap*.

A Figura 41 apresenta os espectros de fragmentação dos analitos para comprovar a identidade dos mesmos.



A

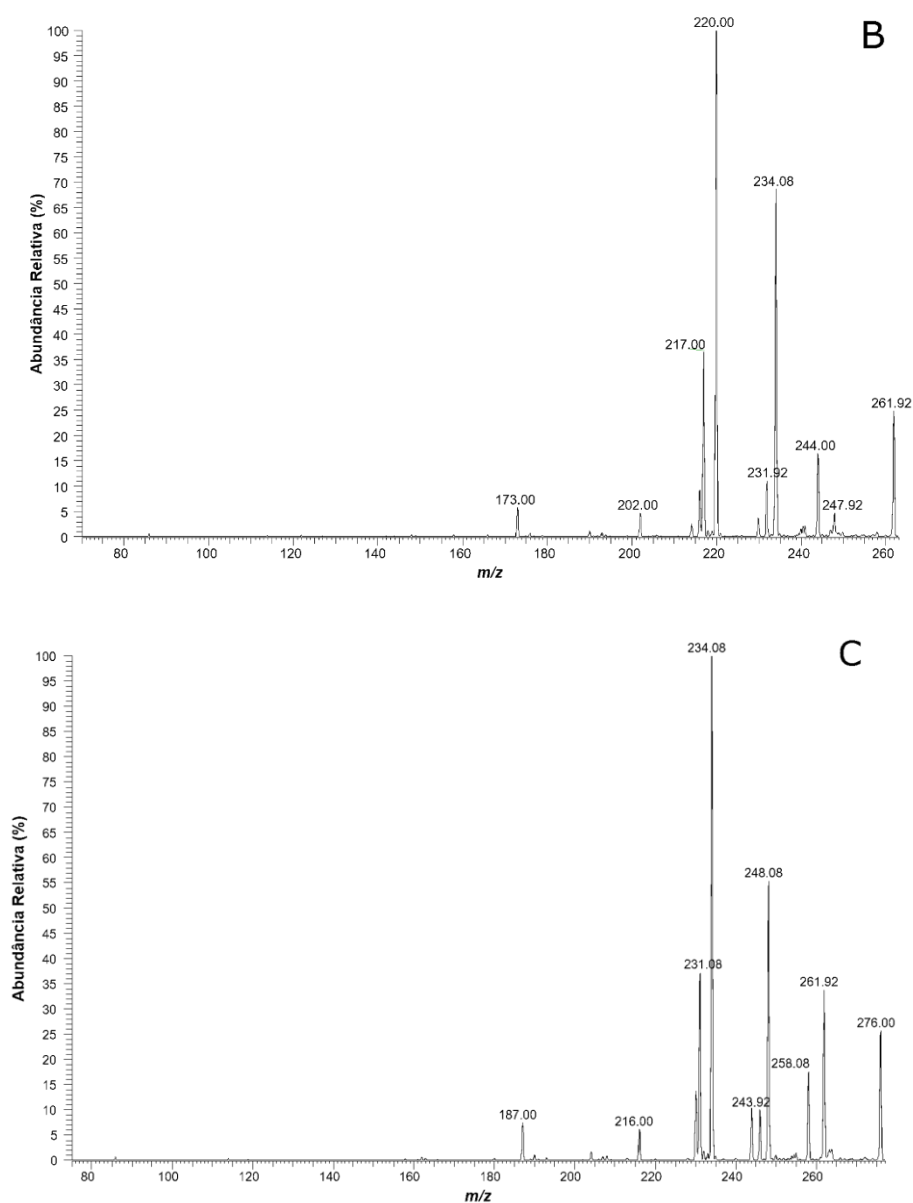


Figura 41. Fragmentação (MS/MS) dos herbicidas: (a) clomazone, (b) imazapir, (c) imazapic, respectivamente.

Alguns trabalhos obtiveram o fragmento m/z 125 para o clomazone e o fragmento m/z 217 confirmam a molécula de imazapir segundo os mesmos autores (PAREJA et al., 2011b; REBELO et al., 2016). Outros autores obtiveram os seguintes fragmentos para imazapic: m/z 231 e 234 (DA COSTA MARINHO et al., 2019).

4.2 - Linearidade

A primeira curva de calibração foi obtida para as concentrações de 200-1200 ng.mL⁻¹ (Figura 42). Para que a faixa linear de trabalho compreendesse os valores de LMR, outra curva de calibração foi preparada nas concentrações de 1 a 150 ng.mL⁻¹. O método apresentou boa linearidade para todos os herbicidas (Figura 43) apresentando $R^2 > 0,98$ em ambas as curvas.

A Tabela 21 apresenta as equações da reta e os valores de R^2 para cada analito em ambas as curvas de calibração.

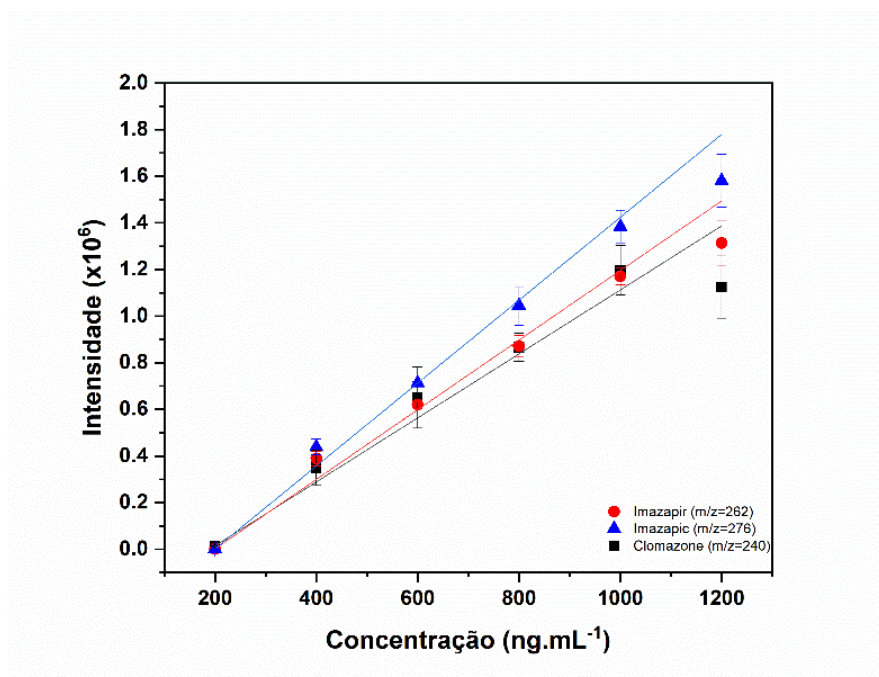


Figura 42. Curva de calibração para clomazone, imazapir e imazapic em solução padrão na faixa linear de 200-1200 ng.mL⁻¹.

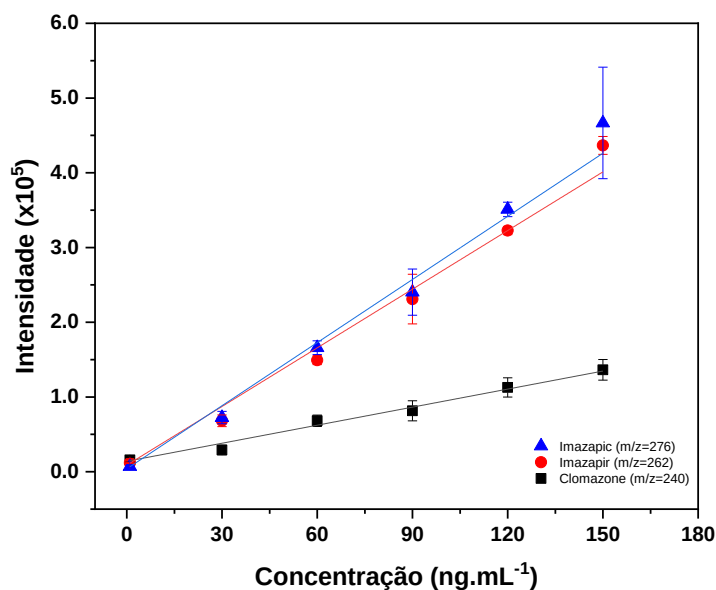


Figura 43. Curva de calibração para clomazone, imazapir e imazapic em solução padrão na faixa linear de 1-150 ng.mL⁻¹.

Tabela 21. Linearidade das curvas de calibração dos herbicidas.

Curva de calibração	Analito	Equação da Reta	R ²
200-1200 ng.mL ⁻¹	Clomazone	y = 1440,8x - 249067	0,9954
	Imazapir	y = 1307,6x - 187927	0,9868
	Imazapic	y = 1580,9x - 246064	0,9912
1-150 ng.mL ⁻¹	Clomazone	y = 829,5x + 11646	0,9872
	Imazapir	y = 2842,6x - 10378	0,9903
	Imazapic	y = 3071,1x - 13599	0,9914

4.3 - Planejamento fatorial

Como etapa prévia as otimizações, foram analisados os diversos experimentos de parâmetros que afetam o processo de extração diretamente. O tempo de extração está diretamente relacionado com a transferência de massa (analito) para a fase receptora, sendo que deve ser definido como o tempo em que o sistema entra em equilíbrio. Para o comprimento da fibra, a mesma deverá ser cortada em um tamanho suficiente para que seja

totalmente coberta pela solução (VILLEGAS-ÁLVAREZ et al., 2020). A Figura 44 apresenta os resultados obtidos para o planejamento fatorial 2³.

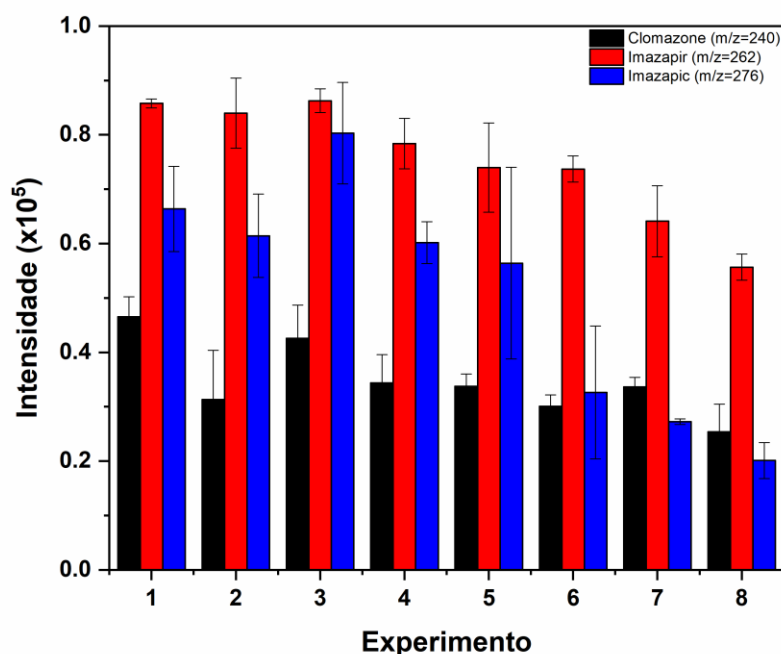


Figura 44. Intensidades obtidas dos analitos em cada experimento.

Todos os experimentos apresentaram valores de intensidade muito aproximados. Para o clomazone, o experimento 1 apresentou melhor resposta. Para o imazapir e imazapic, o experimento 3 apresentou melhores resultados para ambos os analitos.

Foi realizado o teste ANOVA para cada analito no planejamento fatorial. Analisou-se os solventes octanol e decanol separadamente por se tratar de um parâmetro qualitativo. A Tabela 22 mostra o resultado da análise estatística para o clomazone.

Tabela 22. Resultado da ANOVA para o clomazone extraído em ambos os solventes em nível de significância ($\alpha=0,05$).

Parâmetro	Octanol		Decanol	
	Média ± Erro	p-valor	Média ± Erro	p-valor
Tempo (1)	-11717 ± 3649	0,0124*	5983 ± 1796	0,0104*
Comprimento da fibra (2)	-416,7 ± 3649	0,9119	-2417 ± 1796	0,2154
Interação (12)	3517 ± 3649	0,3634	-2317 ± 1796	0,2332

Os dados indicam que o parâmetro tempo é significativo na extração do clomazone em octanol e decanol. Como o resultado do parâmetro apresenta-se negativo, para ambos os solventes, o menor tempo de extração apresenta melhor resposta para a análise.

A Tabela 23 mostra o resultado da análise estatística para o imazapir.

Tabela 23. Resultado da ANOVA para o imazapir extraído em ambos os solventes em nível de significância ($\alpha=0,05$).

Parâmetro	Octanol		Decanol	
	Média $\pm$ Erro	p-valor	Média $\pm$ Erro	p-valor
Tempo (1)	-4833 $\pm$ 2391	0,0779	-4350 $\pm$ 3179	0,2084
Comprimento da fibra (2)	-2567 $\pm$ 2391	0,3143	-13950 $\pm$ 3179	0,0023*
Interação (12)	3067 $\pm$ 2391	0,2355	-4083 $\pm$ 3179	0,2349

Para a extração de imazapir em octanol, nenhum parâmetro se mostrou significativo. Os dados indicam que o parâmetro comprimento da fibra é significativo na extração do analito em decanol. Como o resultado do parâmetro apresenta-se negativo, o menor comprimento de fibra apresenta melhor resposta para a análise em decanol.

A Tabela 24 mostra o resultado da análise estatística para o imazapic.

Tabela 24. Resultado da ANOVA para o imazapic extraído em ambos os solventes em nível de significância ($\alpha=0,05$).

Parâmetro	Octanol		Decanol	
	Média $\pm$ Erro	p-valor	Média $\pm$ Erro	p-valor
Tempo (1)	12533 $\pm$ 4300	0,0195*	15450 $\pm$ 6258	0,0388*
Comprimento da fibra (2)	6333 $\pm$ 4300	0,1790	-20850 $\pm$ 6258	0,0104*
Interação (12)	-7600 $\pm$ 4300	0,1151	6258 $\pm$ 6258	0,2205

Para a extração de imazapic em octanol, o único parâmetro significativo foi o tempo de extração. O resultado negativo indica que a extração do analito é favorecida quando é realizada em menor tempo. Em decanol, os dados indicam que os parâmetros tempo e comprimento da fibra são significativos na extração do analito. Como o resultado dos

parâmetros apresentam-se negativos, o menor tempo e o menor comprimento de fibra apresentam melhor resposta para a análise em decanol.

Em nenhum dos dados analisados, para todos os analitos, a interação entre os dois parâmetros se apresentou significativa.

4.4 - Teste Variação de Concentração no LMR

As legislações afirmam que o Estudo de Resíduo deve ser conduzido com o agrotóxico para estabelecer ou confirmar o LMR de seus ingredientes ativos. Nesse intuito, o experimento apresentou resultados similares para os três níveis analisados de acordo com a Figura 45.

Como pode ser observado, os três experimentos mostraram valores de intensidade próximos para ambos os herbicidas. Dentre os herbicidas, o imazapir apresentou uma melhor resposta frente aos outros analitos.

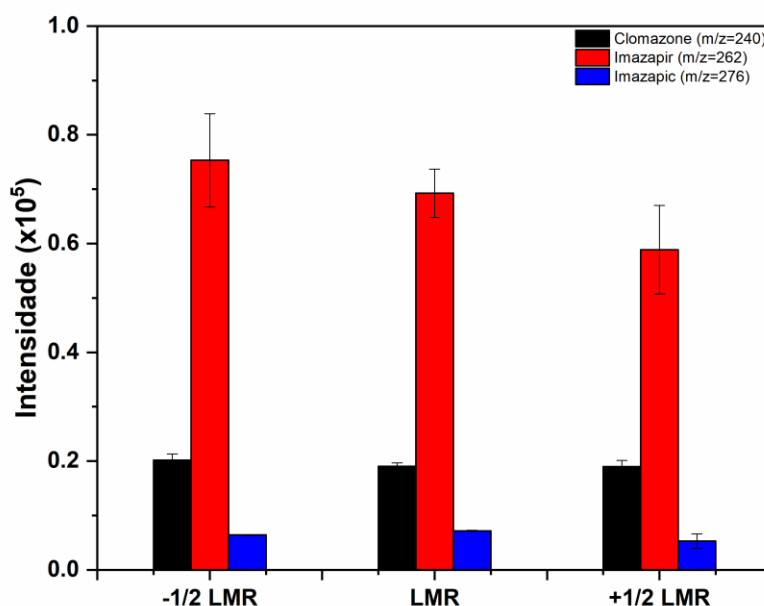


Figura 45. Intensidade dos analitos nas análises próximas ao LMR.

4.5 - Teste do pH e Força Iônica

A Figura 46 apresenta a resposta dos testes de pH e força iônica. Os resultados obtidos com a microextração podem ser afetados significativamente com a adição de sal e

mudança da força iônica da solução contendo os analitos. Devido ao efeito *salting-out*, que é quando a concentração de sal se torna muito alta, a solubilidade dos analitos diminuem na fase aquosa, em contrapartida, a eficiência de extração pela fase orgânica pode ser aumentada (GONZÁLEZ-CURBELO et al., 2013; MERIB; CARASEK, 2013).

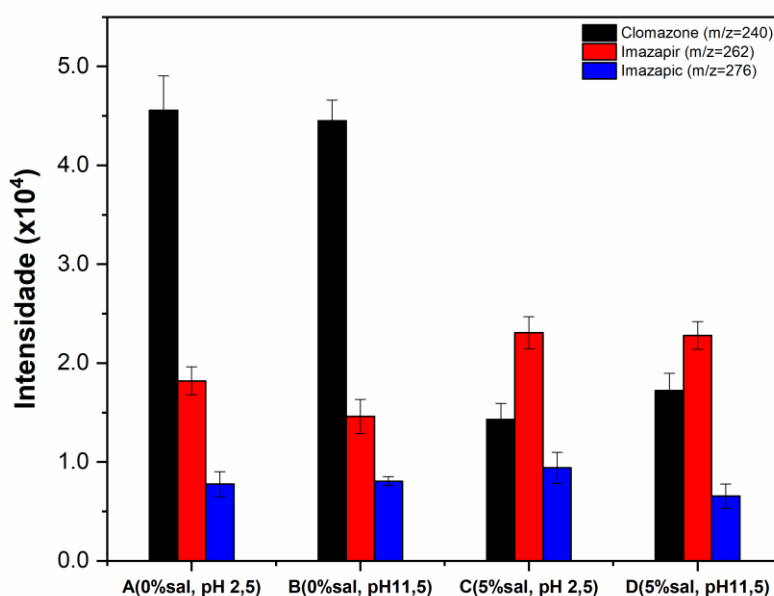


Figura 46. Valores de intensidade após alteração de pH e adição de sal.

Com base nas intensidades obtidas, observa-se que o clomazone apresentou melhor resposta nos experimentos sem adição de sal. Os experimentos A (pH 2,5) e B (pH 11,5) apresentaram resposta similar para o analito. Imazapic e Imazapir apresentaram melhor resposta em experimentos com adição de sal (C e D).

4.6 - Sistema Trifásico

O sistema trifásico é composto por três fases, sendo a fase doadora composta pela amostra aquosa contendo os analitos, a fase orgânica, a qual preenche o lúmen oco da fibra composta pelo solvente octanol e para fase aceptora aquosa foi escolhida a água. A fase orgânica funciona como uma barreira entre a solução aceptora e a solução doadora, não permitindo a mistura das duas fases aquosas (CHA, 2013; TAN et al., 2012). Como o pH é um parâmetro muito importante neste caso, afetando a eficiência de extração, a fase doadora

foi ajustada para pH 1,7 no primeiro experimento, 2,5 para o segundo e para o terceiro experimento não houve alteração, valores estes necessários para manter os analitos na forma ionizada (de acordo com os valores de pKa, Tabela 2). Os valores de pH's devem ser selecionados para serem ligeiramente menores e maiores que o valor do pKa do analito. Como a fase aceptora deve conter um pH mais elevado que a fase doadora, houve a necessidade de elevar o pH da fase aceptora para 12 com adição de uma solução de NaOH 2 mol.L⁻¹. A Figura 47 representa os resultados.

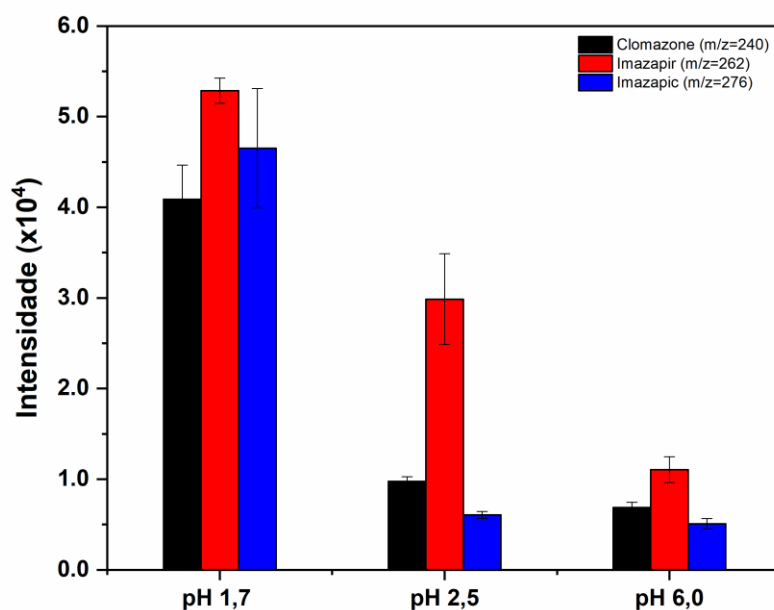


Figura 47. Valores de intensidade para cada analito após teste trifásico.

O experimento 1, no qual a fase doadora teve o pH ajustado para 1,7 se mostrou bastante eficiente em relação aos outros dois experimentos, obtendo intensidades significativas e próximas para ambos os herbicidas. Comparando os três experimentos, é notório que a intensidade dos analitos foram abaixando conforme se aumentou o pH da fase doadora. A intensidade para clomazone e imazapic foram próximas no experimento 2 e 3, mas em comparação, a intensidade de imazapir foi significativamente mais elevada no experimento 2.

4.7 - Comparação entre os Testes

Dispostos de todos os resultados obtidos nos testes, a Figura 48 representa a comparação entre os testes adicionais realizados. É importante destacar que estes resultados são expressos para os experimentos realizados nas concentrações do LMR.

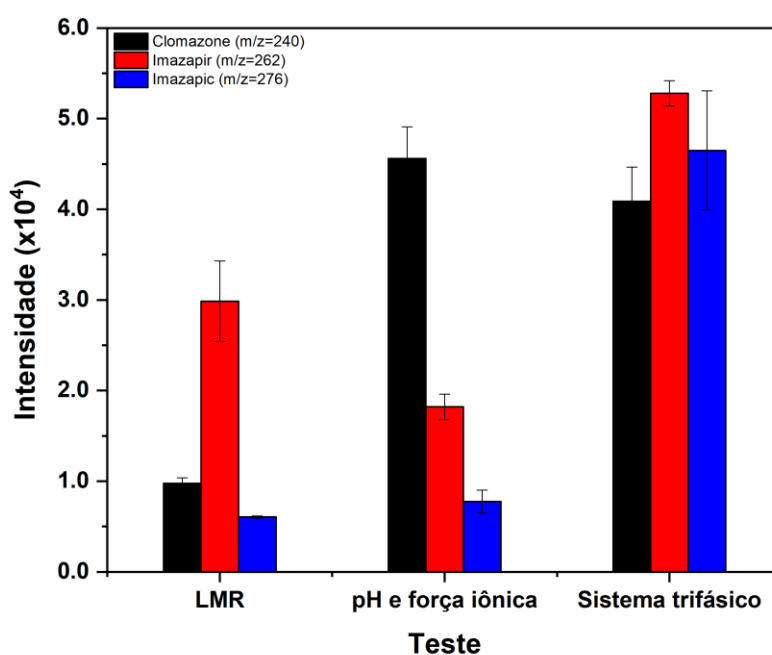


Figura 48. Comparação entre os teste realizados.

O clomazone obteve intensidade similar tanto no teste de pH e força iônica quanto no teste trifásico, sendo possível observar que o mesmo se ioniza melhor sem adição de sal e no sistema bifásico. Entretanto, quando realizado o teste no LMR, sua ionização caiu significativamente. É importante destacar aqui que este teste não tem variação na força iônica e nem variação do pH das soluções. O mesmo acontece com o Imazapir, quando realizado o teste trifásico, apresentou boa ionização, mas houve uma queda significativa quando realizado o teste de pH e força iônica. Isso pode ter relação com a fase aceptora utilizada, já que para o sistema bifásico, a fase aceptora utilizada foi o octanol, ao contrário do sistema trifásico, que utilizou água em pH 12 como fase aceptora. O imazapir também mostrou uma melhora considerável na ionização quando aplicado o teste trifásico, porém, no teste no LMR e no teste de pH e força iônica obteve-se uma ionização muito baixa. Para experimentos futuros, a aplicação do teste trifásico poderá ser uma possibilidade, já que o mesmo se

mostrou mais eficaz que os demais testes.

4.8 - Novo Planejamento Fatorial para octanol e decanol

A fim de otimizar os experimentos, para encontrar valores ótimos de tamanho de fibra e tempo de extração realizou-se um planejamento fatorial para cada solvente. A Figura 49 apresenta os resultados destas análises.

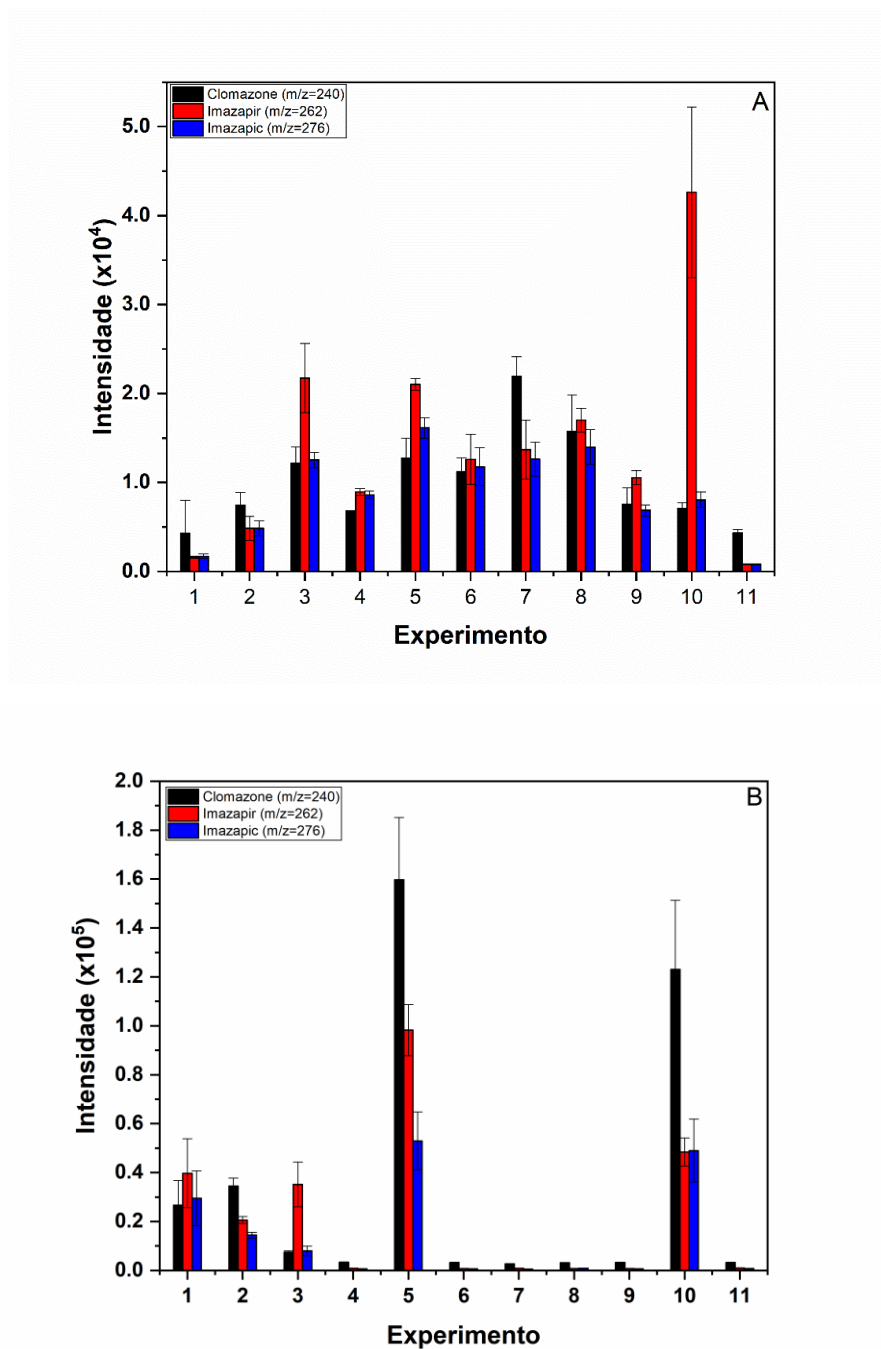


Figura 49. Novo planejamento fatorial em (a) octanol e (b) decanol.

Quando os experimentos são realizados em octanol, para o clomazone, o experimento 7 (menor comprimento de fibra) apresentou melhor resposta, para imazapir o experimento 10 (tempo e comprimento intermediários) e para o imazapic o experimento 5 (menor tempo e comprimento intermediário) apresentou melhor intensidade de sinal. Para o decanol, o experimento 5 apresentou melhor resposta para todos os analitos. As condições desse experimento são: 6 minutos de extração e 10 cm de fibra. Percebe-se que um baixo tempo de extração é suficiente para apresentar uma melhor resposta na intensidade de sinal obtida para os analitos quando esses experimentos são realizados em decanol.

4.9 - Sistema trifásico utilizando decanol

Como as extrações em decanol apresentaram melhor resposta no planejamento fatorial, optou-se por realizar experimentos univariados (Figura 50) para testar quais condições seriam mais favoráveis para a extração dos herbicidas em solução aquosa.

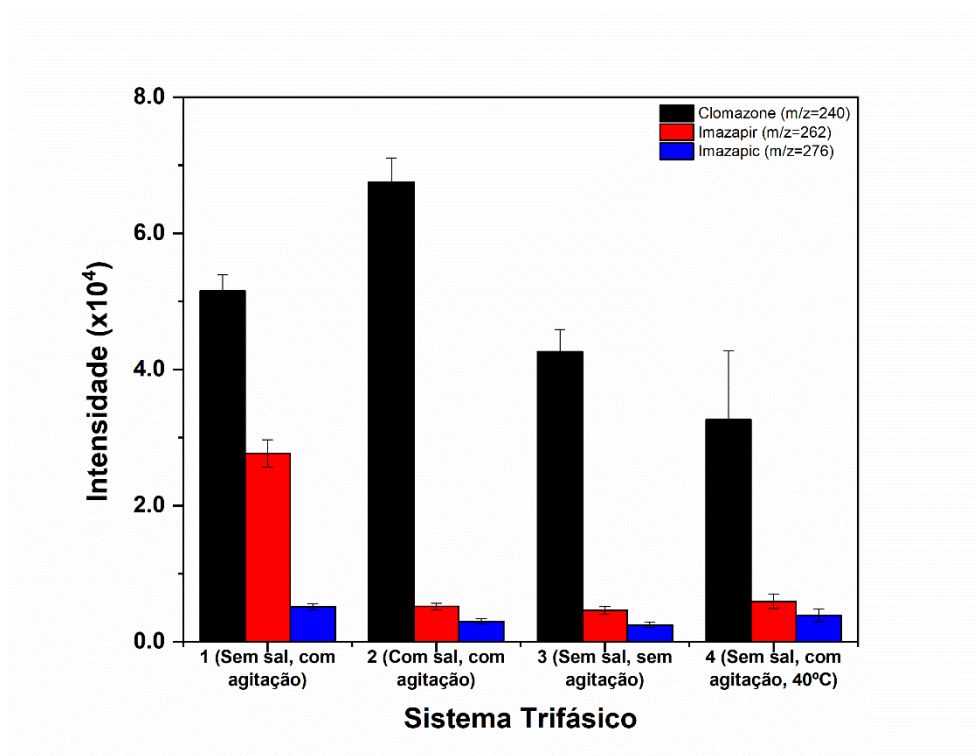


Figura 50. Sistema trifásico utilizando decanol.

Para o clomazone percebe-se que o experimento 2 foi o mais favorável. Para o imazapir e imazapic, o experimento 1 apresentou melhor resposta. O aumento da

temperatura não influenciou na melhoria da extração dos analitos.

4.10 - Sistema trifásico otimizado

A Figura 51 apresenta os resultados para o teste realizado em sistema trifásico, com octanol. Este experimento foi realizado com tempo de agitação de 10 minutos e utilizando 8 cm de fibra oca, não houve adição de sal e o pH da fase doadora = 1,7 e pH da fase aceptora = 12.

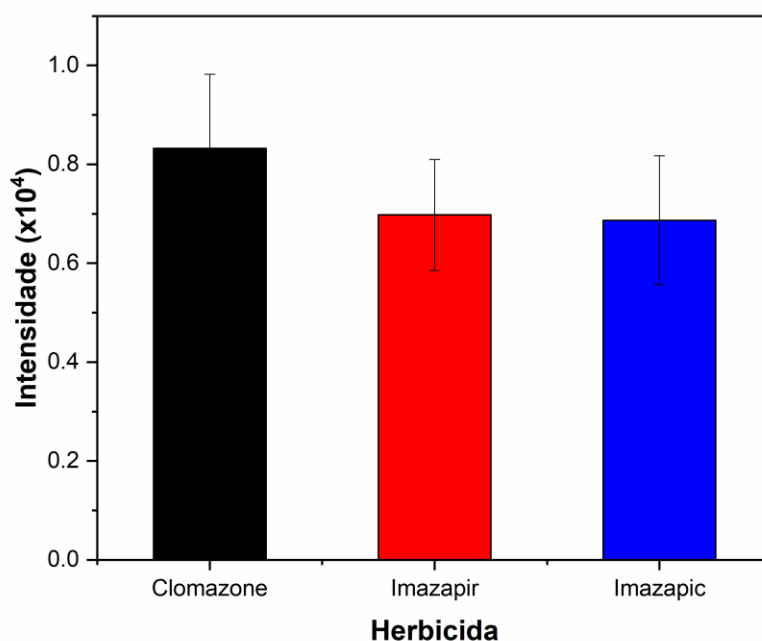


Figura 51. Sistema trifásico otimizado (concentrações dos analitos no LMR, ou seja, clomazone = 10 ng.mL^{-1} e imazapir e imazapic = 50 ng.mL^{-1}).

Percebe-se que o clomazone teve melhor resposta quando comparado aos outros dois herbicidas (imazapir e imazapic). O clomazone estava em menor concentração (10 ng.mL^{-1}) enquanto os outros dois analitos apresentam concentração cinco vezes maior. A melhor resposta para o clomazone pode ser explicada através da difusão desta molécula facilitada devido a menor concentração no sistema de extração.

O desenvolvimento de métodos analíticos representa um processo em várias etapas e a fase inicial envolve os testes em condições controladas para garantir a validade e robustez do método. Nesse sentido, estes experimentos apresentados neste capítulo representam uma

otimização do método de extração proposto para o estudo de extração dos herbicidas utilizando HF-LPME. Todas as análises foram realizadas em solvente orgânico sendo possível serem aplicadas futuramente em amostras reais de arroz.

5 - Conclusão

O presente trabalho investigou a influência de três variáveis para a HF-LPME (tempo de agitação, comprimento da fibra e solvente orgânico) na análise de agroquímicos, além de testes adicionais como a alteração de pH, força iônica e utilização do sistema trifásico. Pela análise de variância, percebe-se que quando utiliza-se os menores tempos de extração e os menores comprimentos de fibra a extração é favorecida.

No teste de pH e força iônica, a adição de sal no sistema não se mostrou eficiente para a extração do clomazone, já que obteve-se melhores intensidades para os experimentos que não continham sal. A alteração do pH não afetou significativamente o sistema, pois as intensidades foram próximas para imazapir e imazapic.

O sistema trifásico quando comparado com o sistema bifásico se mostrou mais eficiente quando o pH da fase doadora é 1,7 e o pH da fase aceptora é 12.

Quando se compara a extração em octanol e decanol, o segundo solvente possui apresenta melhor resposta em comparação com o primeiro.

No sistema trifásico, em decanol, percebe-se que o clomazone é melhor extraído no sistema que contém adição de sal. E o aumento da temperatura não influencia nesse sistema.

A técnica apresenta vantagens em relação a outras técnicas convencionais de microextração. Um exemplo é a utilização de amostras mais complexas. Utiliza também baixo volume de solventes, baixo custo dos implementos e possibilita a utilização de várias fibras ocas compostas por materiais diferentes nos quais podem apresentar resultados distintos mas não menos importantes.

Capítulo IV:

**Análise quimiométrica de amostras de arroz não
contaminadas e contaminadas com fungicidas a partir da
análise direta por espectrometria de massas em modos
ESI(+) e ESI(-)**

1 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 – Fungicidas e seu uso na produção de arroz

Fungicidas são definidos como compostos químicos ou biológicos utilizados com o propósito de impedir o crescimento, eliminar ou regular a disseminação de fungos patogênicos em plantas, materiais e ambientes, com o intuito de reduzir os prejuízos ocasionados por doenças fúngicas (JAMPILEK, 2016).

Aproximadamente um terço da produção agrícola é perdida devido à infestação de fungos patogênicos. Estes organismos são responsáveis por cerca de 30% de todas as doenças agrícolas documentadas (VIEIRA et al., 2016).

Estes compostos são aplicados em várias etapas da produção do alimento. Essa aplicação pode ser realizada no campo, após a colheita ou durante a estocagem do alimento. Ao ser aplicado no vegetal, os fungicidas barram as vias bioquímicas específicas da planta e apresentam dois diferentes mecanismos de ação (sistêmico e não sistêmico). No primeiro, a planta absorve o fungicida e o distribui por todo o vegetal. No segundo, o fungicida apresenta ação tópica (ou seja, no local da aplicação) (VIEIRA et al., 2016). Existem algumas identificações para as diferentes formas de ação dos fungicidas: curativos (apresentam ação após a penetração no fungo), protetivos (impedem a germinação de esporos e infecção) e erradicantes (ativos quando o fungo já é visível) (REIS; REIS; CARMONA, 2010).

A aplicação de fungicidas no cultivo de arroz é uma prática comum para o controle de doenças fúngicas que podem afetar negativamente o rendimento e a qualidade dos grãos. Existem várias doenças fúngicas que podem afetar o arroz, e a escolha do fungicida e o momento da aplicação dependem do tipo de doença presente na região e das condições climáticas. As doenças mais comuns causadas por fungos em plantações de arroz são a brusone do arroz (*Magnaporthe oryzae*), queima da bainha do arroz (*Rhizoctonia solani*) e mancha parda (*Bipolaris oryzae*) (BORDIN et al., 2016).

Existem diferentes fungicidas registrados e recomendados para o controle de doenças fúngicas no arroz, e eles podem conter diferentes ingredientes ativos, como triazóis, estrobilurinas, carboxamidas e multissítios (HIROOKA; ISHII, 2013). Alguns exemplos de fungicidas amplamente utilizados no Brasil para o controle de doenças no arroz incluem: azoxistrobina, ciproconazol, epoxiconazol, piraclostrobina, protioclonazol, tebuconazol, tricloclazol e trifloxistrobina (SANTOS et al., 2005). Devido à grande variedade de fungicidas

usados no cultivo de arroz, mostra-se importante o desenvolvimento de métodos de análise para identificação de fungicidas em matrizes distintas.

Entre as técnicas de análises disponíveis e conhecidas, a espectrometria de massas é uma técnica analítica que permite a identificação de compostos em amostras complexas, além de ser uma técnica versátil que possibilita a análise direta de fungicidas com alta sensibilidade e seletividade.

1.2 – Análise direta por espectrometria de massas de alta resolução em equipamento do tipo Q-TOF

A análise direta por espectrometria de massas é uma técnica amplamente utilizada para a análise de compostos químicos em uma amostra. Ela permite a determinação da massa molecular dos compostos, bem como a identificação e caracterização de suas estruturas químicas (COOKS et al., 2006).

A ESI-MS é uma técnica de ionização branda na qual a solução da amostra é injetada (*spray*) do fim de um capilar até uma câmara aquecida. O capilar possui uma alta voltagem e as gotículas saem dele com carga. Um gás secante remove as moléculas de solvente, restando somente os íons na fase gasosa. A ESI permite análise de amostras voláteis e não voláteis (GROSS, 2011).

A análise direta por ESI-MS oferece várias vantagens, como a capacidade de analisar amostras sem a necessidade de separação prévia dos componentes. A ESI-MS é aplicada em várias áreas, como química orgânica, química medicinal, proteômica, metabolômica, entre outras. É uma técnica versátil e sensível, capaz de fornecer informações valiosas sobre a composição química de uma amostra (HECK; VAN DEN HEUVEL, 2004; LOO, 2000).

A espectrometria de massas empregando analisadores por Tempo de Voo (TOF, *time of flight*) representa uma técnica instrumental que permite determinar a massa de íons com base no tempo que eles levam para percorrer um caminho conhecido. A técnica é aplicada desde 1940 e apenas 50 anos mais tarde tornou-se um dispositivo convencional em espectrometria de massas (GUILHAUS, 2005).

Os instrumentos de tempo de voo (TOF), tornaram-se a base de muitos trabalhos modernos, devido à sua eletrônica rápida e precisa e às técnicas modernas de ionização, como o ESI. Um instrumento TOF fornece uma medição precisa da massa para algumas partes por milhão (ppm) da massa verdadeira de uma molécula (GUILHAUS, 2005).

As análises de TOF envolvem a aceleração de um grupo de íons, em uma breve explosão, para um detector. Os íons saem da fonte, cada um tendo recebido de um eletrodo "empurrador" uma carga ou potencial elétrico idêntico. O potencial de cada íon acelera ou dispara em um tubo de pressão muito baixa. Como todos os íons são carregados de maneira semelhante compartilham a mesma energia cinética ($E_c = \frac{1}{2} m.v^2$ em que m é a massa do íon e v a velocidade), aqueles com massas mais baixas evidenciam maior velocidade e um intervalo menor antes de atingir o detector. Como massa, carga e energia cinética determinam o tempo de chegada de um íon ao detector, a velocidade do íon pode ser representada como $v = d/t$. Os íons viajam uma determinada distância (d), no tempo (t), onde t depende da razão massa/carga (m/z). Como todas as massas são medidas para cada "empurrão", o instrumento TOF pode alcançar uma sensibilidade muito alta em relação aos instrumentos de varredura (GUILHAUS, 2005; LANÇAS, 2013).

Os espectrômetros de massas do tipo quadripolar (Q) examinam rotineiramente a 10.000 Da por segundo. Portanto, uma varredura abrangente, mesmo de curta duração - um pico de LC ou GC de 1 segundo, por exemplo - capturaria cada íon 10 vezes, ou mais, a cada segundo. O detector do instrumento TOF registra íons que bombardeiam a placa em nanossegundos um do outro. Essa resolução oferece os recursos adicionais de uma ampla faixa dinâmica e maior sensibilidade quando comparada diretamente a um instrumento de digitalização, como um quadrupolo. Até o advento dos instrumentos híbridos, ninguém conseguia oferecer desempenho de alta ordem em todos os aspectos (GROSS, 2011).

O espectrômetro de massas híbrido do tipo quadrupolo no tempo de voo (Q-TOF) une um instrumento TOF com um instrumento quadrupolo (Figura 52). Esse emparelhamento resulta na melhor combinação de várias características de desempenho: medição de massa precisa, capacidade de realizar experimentos de fragmentação e quantificação de alta qualidade (MBASU et al., 2016).

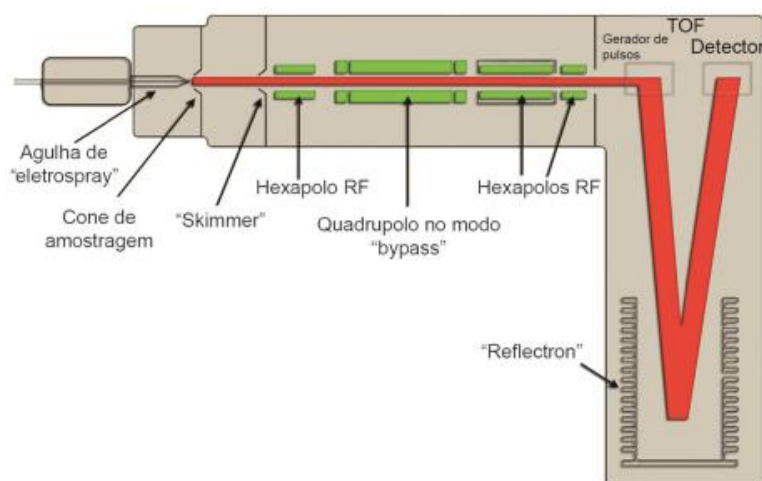


Figura 52. Analisador do tipo Q-ToF. Fonte: (LANÇAS, 2013).

A quimiometria é uma disciplina da área da química que emprega as ferramentas da matemática e estatística para planejamento e otimização de experimentos para fornecer o máximo de informações com a análise dos dados obtidos (FERREIRA et al., 1999). Essa ciência pode ser aplicada em diversas áreas da química, inclusive à espectrometria de massas.

1.3 – Análise quimiométrica e aplicação em espectrometria de massas

A análise quimiométrica desempenha um papel importante na interpretação e extração de informações significativas dos dados gerados pela análise direta via ESI-MS. A combinação da espectrometria de massas com a análise quimiométrica permite explorar e extrair conhecimento a partir de conjuntos de dados complexos, facilitando a identificação de padrões, a classificação de amostras e a modelagem preditiva (BASTOS et al., 2020; RAJI; SCHUG, 2009).

A análise por infusão direta por ESI-MS é uma das técnicas mais versáteis e eficientes para *fingerprint* e detecção de compostos químicos em plantas e fungos. De forma integrativa, abordagens baseadas em MS em combinação com ferramentas estatísticas são interessantes na avaliação do efeito extrator de solventes diferentes e também a quantidade de compostos extraídos dando destaque para compostos *target* (molécula-alvo) (BASTOS et al., 2020; SÁ; DA SILVA; NUNOMURA, 2022). Mas, vários fatores instrumentais influenciam a resposta do analito em ESI-MS. É importante identificar os parâmetros-chave que provocam maior

influência na intensidade e qualidade do sinal do analito. Técnicas baseadas em quimiometria tem sido empregadas para otimizar condições experimentais em diferentes campos da ciência (RAJI; SCHUG, 2009).

Atualmente, algoritmos de *fingerprints* e reconhecimento de padrões representam poderosas ferramentas para a caracterização e misturas complexas. Recomenda-se o uso dessas ferramentas em cromatografia, mas também as técnicas espectrais que podem levar a resultados interessantes e úteis (MEDVEDOVICI et al., 2014).

Na última década houve avanço nos procedimentos de *fingerprint* com aplicação de métodos quimiométricos. Pode-se citar: análise de componentes principais (PCA) e mínimos quadrados parciais (PLS) (MEDVEDOVICI et al., 2014).

1.3.1 – Ferramentas estatísticas multivariadas aplicadas na análise quimiométrica

A PCA é um algoritmo matemático que reduz a dimensionalidade dos dados, mantendo a maior parte das variáveis no conjunto de dados. Essa redução é feita identificando direções, chamadas componentes principais (PCs). O número de componentes principais é sempre menor ou igual ao número de variáveis originais. É possível agrupar amostras e visualizar suas semelhanças e diferenças. A PCA identifica novas variáveis, os componentes principais, que são combinações lineares das variáveis originais (RINGNÉR, 2008).

As principais vantagens da PCA são a baixa sensibilidade ao ruído, não redundância de dados e a redução de ruído já que é escolhida a base de variação máxima e assim as pequenas variações são ignoradas automaticamente. As desvantagens são: a matriz de covariância é difícil de ser avaliada de maneira precisa e a não variância não pode ser detectada pela PCA a menos que os dados forneçam essa informação explicitamente (KARAMIZADEH et al., 2013).

O modelo PCA é calculado a partir do produto vetorial entre os escores (T) (distribuição das amostras no espaço multidimensional) e a transposta dos *loadings* (P) (pesos de cada variável na distribuição das amostras no espaço multidimensional) somados a uma matriz de erro (E) que regula o produto vetorial, de acordo com a equação:

$$X = T \cdot P^t + E$$

onde X é a matriz de dados $I \times J$, T é a matriz $I \times A$ do vetor de escores, P^t é a transposta do vetor de *loadings* (FERREIRA et al., 2023).

A PLS (*Partial Least Squares*), ou mínimos quadrados parciais, representa uma técnica de regressão multivariada que busca encontrar relações entre variáveis independentes e dependentes, útil para prever ou modelar resultados a partir de dados complexos. Ela é comumente usada em quimiometria e análise de dados, especialmente em situações onde há muitas variáveis independentes e correlações complexas entre elas. A PLS ajuda a simplificar a modelagem e a lidar com dados ruidosos, permitindo a criação de modelos preditivos robustos (STOCCHERO, 2023).

A PLS-DA (*Partial Least Squares Discriminant Analysis*) ou análise discriminante de mínimos quadrados parciais é uma ferramenta multivariada de redução de dimensionalidade que tem se popularizado no campo da quimiometria e tem sido recomendados para uso no tratamento de dados de grande volume, dados com ruídos ou dados faltantes. A PLS-DA pode ser considerada uma versão "supervisionada" da PCA no que se refere à redução da dimensionalidade dos dados. É uma técnica de análise multivariada que combina elementos da regressão parcial (PLS) com análise discriminante para identificar padrões ou características distintivas que permitem discriminar entre diferentes grupos ou classes de dados. É usada principalmente em análise de dados multivariados, classificação e separação de grupos com base em informações multivariadas, como espectroscopia, dados ômicos e outras aplicações em que a diferenciação entre grupos é fundamental (RUIZ-PEREZ et al., 2020).

A sPLS-DA (*sparse Partial Least Squares Discriminant Analysis*) é uma técnica de análise de dados multivariada e de aprendizado de máquina usada para análise e classificação de dados em grupos distintos. Ela é uma variação da técnica PLS-DA, que é frequentemente aplicada em análise discriminante para separar grupos ou classes com base em características multivariadas. A principal característica da sPLS-DA é a esparsidade, o que significa que ela seleciona apenas as características (variáveis) mais relevantes para a discriminação entre as classes, tornando o modelo mais fácil de interpretar e reduzindo o risco de *overfitting* (ajuste excessivo). Isso é particularmente útil quando se lida com conjuntos de dados de alta dimensionalidade, nos quais muitas variáveis podem não ser informativas para a discriminação de classes (JIMÉNEZ-CARVELO et al., 2021).

A orthoPLS-DA ou oPLS-DA (*Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis* ou Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais Ortogonais) é uma técnica avançada

de análise de dados multivariados que é frequentemente usada em quimiometria e análise de dados ômicos para a classificação e discriminação de grupos ou classes distintas. A orthoPLS-DA é uma extensão do PLS-DA e é projetado para melhorar a interpretabilidade e o desempenho dos modelos de discriminação. A orthoPLS-DA é amplamente utilizada em aplicações de classificação e discriminação, como a identificação de biomarcadores em análises ômicas, a diferenciação entre grupos de pacientes e controles em estudos clínicos e a classificação de produtos químicos em análises de qualidade. Essa técnica é especialmente valiosa quando se lida com dados multivariados de alta dimensão e deseja-se obter modelos de discriminação robustos e interpretáveis (CLARKE; SOMERFIELD; GORLEY, 2016; VALASI; KOKOTOU; PAPPAS, 2021).

1.3.2 – Representação dos dados em análise multivariada

Os gráficos de escores (*scores plots*) e os gráficos de loadings (*loadings plots*) são ferramentas importantes na PCA e na análise multivariada de dados. Os gráficos de escores ajudam a entender como as amostras se comparam e como elas se distribuem ao longo dos PCs. Eles são úteis para a identificação de grupos de amostras semelhantes ou anômalas e para visualizar a variação entre as amostras. Por outro lado, os gráficos de *loadings* são úteis para interpretar e identificar as características que mais contribuem para os padrões observados nos dados. Eles são frequentemente usados para a seleção de variáveis importantes em análises de dados e para entender as relações entre variáveis em estudos multivariados. Ambos os tipos de gráficos desempenham papéis essenciais na interpretação de modelos de PCA e ajudam a extrair informações úteis dos dados multivariados (KARAMIZADEH et al., 2013; RINGNÉR, 2008).

O dendograma é um gráfico de árvore que representa como as observações ou amostras se agrupam com base em sua similaridade ou dissimilaridade. Cada observação é representada por um nó, e as conexões entre os nós indicam o grau de semelhança entre as observações. Esta representação é usada para identificar padrões naturais de agrupamento nos dados. Quanto mais próximo dois nós estiverem no dendrograma, mais semelhantes são as observações correspondentes (CLARKE; SOMERFIELD; GORLEY, 2016; HARTIGAN, 1967). A medida de distância de Spearman é uma métrica utilizada para quantificar a dissimilaridade entre duas listas de dados. É utilizada em análise estatística

para avaliar quão bem as ordens ou classificações dos dois conjuntos de dados estão relacionados, independentemente dos valores específicos dos dados.

1.3.3 - Normalização dos dados na análise quimiométrica

A normalização de dados é uma etapa importante em análises estatísticas pois ajuda a tratar diferenças nas escalas e variações nos dados. Existem diferentes métodos de normalização que apresentam abordagens distintas para ajustar os dados de maneira que eles possam ser analisados de maneira mais apropriada. São eles: dados sem normalização (representam os dados brutos sem nenhuma transformação); na normalização pela soma (somatório de todos os valores no conjunto de dados. Os valores normalizados variam de 0 a 1. É útil quando quer se comparar a contribuição relativa de cada valor em relação ao somatório, independente das unidades originais); na normalização pela mediana (cada valor é dividido pela mediana de todos os valores do conjunto de dados. É útil quando os dados são assimétricos ou contém valores extremos); na normalização pelo quantil (os dados são organizados em ordem crescente e cada valor é substituído pela mediana dos valores originais. É útil quando se deseja tornar os dados comparáveis, mantendo a forma da distribuição original) (WALACH; FILZMOSER; HRON, 2018).

2 - OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral

Investigar possíveis variações metabólicas em amostras de arroz submetidas à contaminação por fungicidas empregando análise direta por espectrometria de massas e ferramentas da quimiometria.

2.2 – Objetivos Específicos

Avaliar o perfil metabolômico de quatro matrizes de arroz distintas: casca, casca e grão, grão polido e grão não polido submetidos a contaminação por fungicidas por ESI-MS.

Analisar as amostras em modos positivo e negativo.

Investigar as possíveis diferenças entre os espectros de massas obtidos empregando ferramentas quimiométricas.

Avaliar qual o melhor modelo para explicar dos dados.

3 - METODOLOGIA

3.1 – Materiais e Reagentes

O solvente Metanol grau HPLC foi obtido da Tedia Company Ltda (Farfield, OH, USA). Hidróxido de amônio e ácido fórmico foram obtidos da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

3.2 – Amostras

Este projeto consiste em uma parceria com o grupo de pesquisa da Escola de Agronomia (EA-UFG) coordenado pela Prof^a Dr^a Virgínia Damin. As plantas foram cultivadas na Embrapa Arroz e Feijão (Santo Antônio de Goiás/GO) e em vasos de 10 L (com 3 plantas cada), onde foram plantadas as amostras de referência (branco) da cultivar BRS Pampeira.

Coleta de amostra real: A coleta dos grãos foi realizada de doze áreas de produção comercial de arroz irrigado, considerando 3 amostras (cada amostra coletada em 3 linhas de 2,5m), de cada área comercial. O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em triplicata. As amostras de grãos foram coletadas cerca de 120 dias após emergência das plântulas. Foram coletadas amostras de arroz com casca.

3.2.1 – Preparo das amostras

Das amostras coletadas, separou-se em quatro matrizes distintas (casca do arroz, arroz com casca, arroz descascado polido, arroz descascado não polido). Para a separação das cascas do grão foi utilizado um descascador de grãos (Embrapa Arroz e Feijão – Santo Antônio de Goiás). O polimento dos grãos foi realizado no mesmo equipamento. Todas essas matrizes foram moídas em moinho analítico (IKA, A11) gerando um pó fino que foram armazenados em potes plásticos com tampa em condições de ambiente de luz, temperatura e umidade.

Cada amostra possui um código distinto apresentado na Tabela 25. Foram analisadas cinco amostras de cada matriz.

Tabela 25. Relação das amostras de arroz analisadas por matriz.

Matriz (Código)	Amostras branco (BT)*	Amostras contaminadas (AR)**
Casca (C)	5	5
Casca + Grão (CG)	5	5
Grão polido (AP)	5	5
Grão não polido (ANP)	5	5

*BT – branco testemunha; **AR – amostra real

Para cada matriz, pesou-se 10 mg do sólido em balança semi-analítica (Shimadzu) e ao *ependorf* adicionou-se 1 mL de MeOH. Agitou-se a mistura por 1 minuto em agitador Vórtex (Gehaka, AV-2). As amostras foram armazenadas em geladeira (4°C) por 12 horas. As amostras foram centrifugadas (Centrífuga IKA, miniG) e filtradas em filtro para seringa PTFE 0,45 µm (Whatman). As amostras foram diluídas na concentração de 1 µg.mL⁻¹ ou 1ppm.

3.3 – Aparato instrumental

Um espectrômetro de massas do tipo Q-TOF (microTOF-QIII, Bruker) foi utilizado nas análises ESI-MS das amostras de arroz. Os experimentos foram realizados nos modos ESI(-) e ESI(+). Os parâmetros instrumentais para a análise foram: energia do capilar =

4000 V, gás de nebulização = 0,4 Bar, gás de secagem = 5 L.min⁻¹, temperatura de secagem = 180 °C. Não foi realizada nenhuma otimização nesses experimentos visto que todas as amostras foram submetidas as mesmas condições de análise para posterior análise quimiométrica.

3.4 – Infusão direta via ESI-MS

Para a leitura de cada amostra realizou-se o seguinte procedimento: a amostra foi adicionada na microseringa que foi colocada em uma bomba seringa do Q-TOF para realização da infusão. O fluxo de trabalho foi de 5 µL.min⁻¹. Os espectros foram adquiridos em modo *fullscan* (faixa de massa de 100-1200 Da) por um minuto em modos positivo e negativo.

3.5 – Análise quimiométrica e tratamento de dados

A análise quimiométrica foi realizada através do site Metaboanalyst 6.0. O pré-processamento foi realizado aplicando o método de normalização pelo íon mais intenso com objetivo de minimizar a redundância de dados, aumentar a integridade dos dados e o desempenho do modelo. Para a análise quimiométrica foram testados diversos algoritmos para avaliação de performance classificatória, sendo eles: PCA, Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (do inglês, *discrimint analysis by partial least squares* (PLS-DA)), Análise Discriminante Esparsa por Mínimos Quadrados Parciais (do inglês, *sparse discriminant analysis by partial least squares* (sPLS-DA)) e Análise Discriminante Ortogonal por Mínimos Quadrados Parciais (do inglês, *orthogonal discriminant analysis by partial least squares* (orthoPLS-DA)).

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para cada uma das amostras em estudo foi realizado a infusão direta do extrato obtido, segundo descrição da sessão experimental 3.2.1. Os extratos foram analisados no modo de ionização negativo no intervalo de massas de 50 a 500 m/z. A Figura 53 apresenta os espectros obtidos, respectivamente, para as seguintes matrizes: casca, casca e grão, arroz polido e arroz não polido no modo negativo.

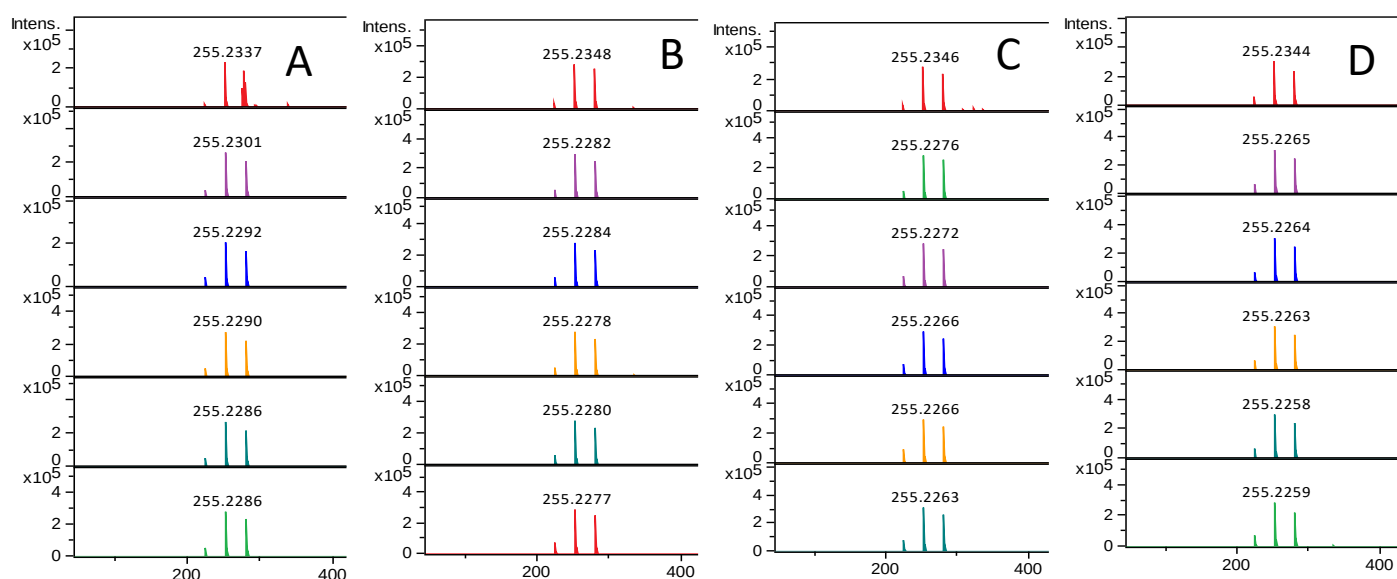


Figura 53. Espectros de massas obtidos para o modo ESI(-) das amostras analisadas da casca (A), casca e grão (B), arroz polido (C) e arroz não polido (D). A primeira linha é referente a amostra sem contaminante, os demais são referentes a amostras com contaminantes.

De acordo com a Figura 53 é possível notar a semelhança entre os perfis dos espectros obtidos para todas as matrizes no modo negativo tendo destaque para o íon (m/z 255,22) que é referente ao ácido palmítico. Os principais ácidos graxos no arroz são os ácidos palmítico (16:0), oléico (18:1) e linoléico (18:2), correspondendo a aproximadamente 95% dos ácidos graxos presentes nos lipídios totais (TAIRA & ITANI, 1988; MANO et al., 1999). Assim, devido à elevada concentração destas espécies foi possível observar que estes sinais podem suprimir sinais menos intensos de compostos que estejam em menor concentração ou que tenha sua ionização dificultada.

Os extratos foram também analisados no modo de ionização positivo no intervalo de massas de 50 a 800 m/z. Vale ressaltar que a faixa de m/z no modo positivo foi maior que

no modo negativo, pois no modo negativo não se observou nenhum sinal após m/z 500 Da.

A Figura 54 apresenta os espectros obtidos, respectivamente, para as mesmas matrizes no modo positivo.

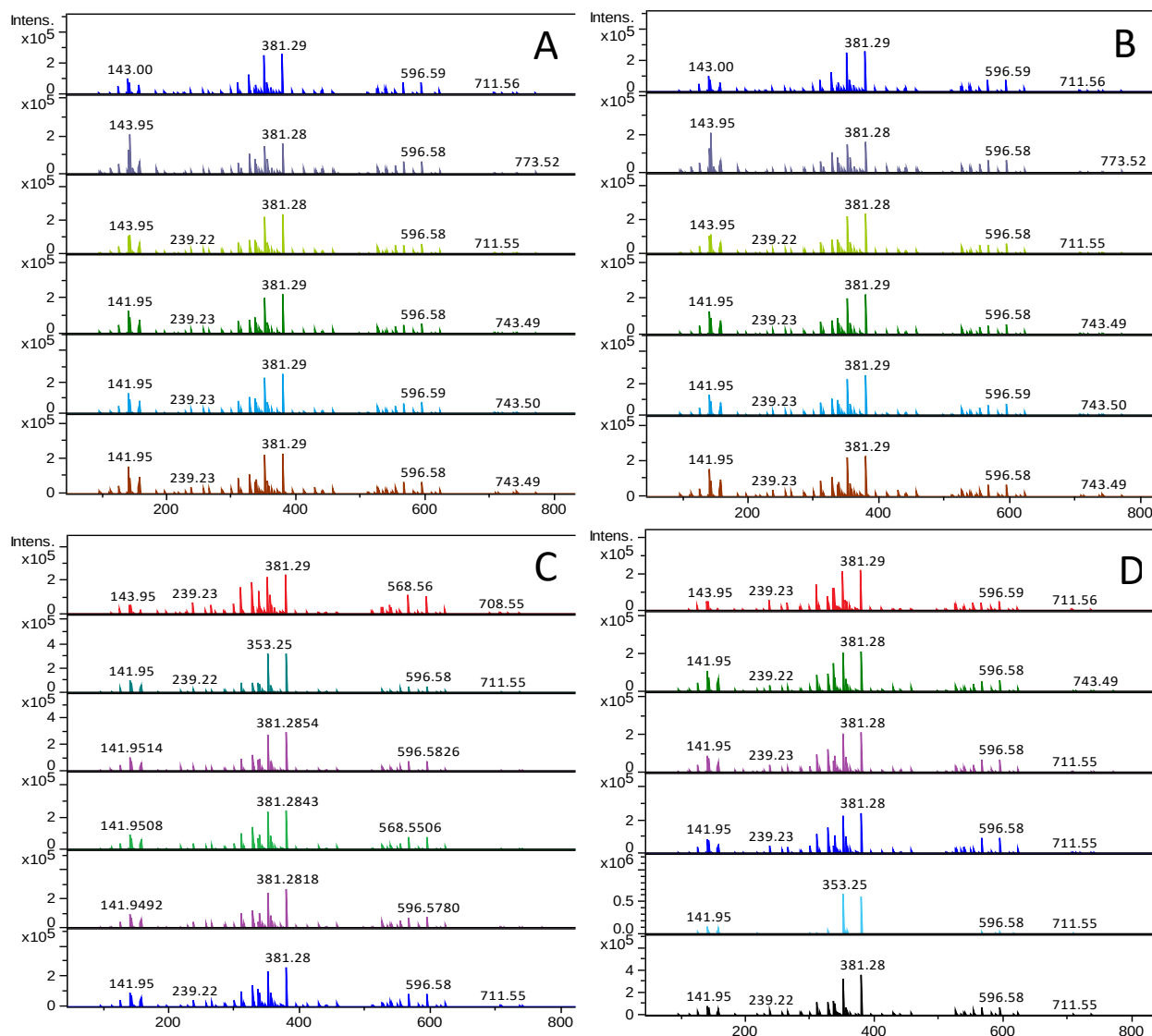


Figura 54. Espectros de massas obtidos para o modo ESI(+) das amostras analisadas da casca (A), casca e grão (B), arroz polido (C) e arroz não polido (D). A primeira linha é referente a amostra sem contaminante, os demais são referentes a amostras com cotaminantes

Dispondo de todos os dados foi construído um modelo baseado em análise de componentes principais (PCA). A informação é representada pela intensidade absoluta dos picos em relação a razão m/z . As variáveis representam as quatro matrizes analisadas

(casca/casca e grão/arroz polido/arroz não polido). Assim, as componentes principais seriam cada uma é uma combinação linear de todas as variáveis originais, independentes entre si.

Foram analisadas 40 amostras, gerando um total de 434 picos no modo negativo, sendo excluídos os picos similares, ou também chamados de valores ausentes (8123 no total). A Tabela 26 apresenta os valores de variância explicada obtidos na análise quimiométrica no modo ESI(-) para os diferentes pré-processamentos de dados e métodos computacionais.

Tabela 26. Valores obtidos de variância explicada para PC1 e PC2 para a análise quimiométrica em modo ESI(-).

Análise Quimiométrica	Sem normalização		Normalização pela soma		Normalização pela mediana		Normalização pelo quantil	
	PC1(%)	PC2(%)	PC1(%)	PC2(%)	PC1(%)	PC2(%)	PC1(%)	PC2(%)
PCA	72,9	16,2	73,7	14,8	71,1	16,2	74,3	15,7
PLS-DA	72,9	7,2	73,7	7,3	71,1	14,2	74,3	11,5
sPLS-DA	29,8	6,8	32,2	5,8	31,5	5,7	32,4	6,5
orthoPLS-DA*	30,0	8,7	32,5	8,8	32,1	12,2	32,4	12,7

*T Score

Para o tratamento de dados, aA variabilidade dos dados são melhores explicadas pelas componentes principais da PC1 com PC2 (sem normalização e com normalização em quantil, 89,1% e 90%, respectivamente) da PCA. Estes dados sugerem que a escolha da normalização pode ter um impacto significativo nos resultados da análise. A Tabela 27 apresenta os dados obtidos da análise quimiométrica dos dados sem normalização interagindo com as diferentes formas de escalonamento.

Os dados obtidos para as primeiras colunas (sem normalização/centrar na média) foram idênticos aos dados obtidos na guia sem normalização (Tabela 26, 89,1% e 80,1%) indicando que não é necessário fazer esse tipo de interação. Os dados obtidos em sPLS-DA e orthoPLSDA, respectivamente 36,6% e 38,7%, foram iguais em todos os tratamentos indicados na Tabela 27. Isso indica que, para este experimento, não é necessário fazer a junção de pré-processamentos. Esse resultado pode indicar a estabilidade do modelo (as abordagens esparsa e ortogonal apresentaram desempenho comparável), ou ainda, que a inclusão do componente ortogonal não está contribuindo significativamente para a melhoria

do modelo. Outra interpretação, é que os resultados da sPLS-DA não estão sendo expressos de maneira significativa para o conjunto de dados.

Tabela 27. Junção do pré-processamento Sem Normalização com as diferentes formas de escalonamento – ESI(-).

	Sem normalização / Centrar na média		Sem normalização / Autoescalar		Sem normalização / Escalar pelo Pareto		Sem normalização / Escalar pelo intervalo	
	PC1(%)	PC2(%)	PC1(%)	PC2(%)	PC1(%)	PC2(%)	PC1(%)	PC2(%)
Análise Quimiométrica								
PCA	72,9	16,2	30,3	14,1	52,9	15,1	48,4	8,9
PLS-DA	72,9	7,2	30,3	8,4	52,8	11,8	48,4	6,8
sPLS-DA	29,8	6,8	29,8	6,8	29,8	6,8	29,8	6,8
orthoPLS-DA*	30,0	8,7	30,0	8,7	30,0	8,7	30,0	8,7

*T Score

A Tabela 28 apresenta os dados obtidos da análise quimiométrica dos dados Normalização pelo quantil interagindo com as diferentes formas de escalonamento.

Tabela 28. Junção do pré-processamento Normalização pelo quantil com as diferentes formas de escalonamento – ESI(-).

	Normalização pelo quantil / Centrar na média		Normalização pelo quantil / Autoescalar		Normalização pelo quantil / Escalar pelo Pareto		Normalização pelo quantil / Escalar pelo intervalo	
	PC1(%)	PC2(%)	PC1(%)	PC2(%)	PC1(%)	PC2(%)	PC1(%)	PC2(%)
Análise Quimiométrica								
PCA	74,3	15,7	30,0	13,5	55,9	16,0	46,1	8,5
PLS-DA	74,3	11,5	30,0	11,7	55,8	14,5	46,1	7,0
sPLS-DA	29,5	7,3	29,5	7,3	29,5	7,3	29,5	7,3
orthoPLS-DA*	29,6	12,1	29,6	12,1	29,6	12,1	29,6	12,1

*T Score

Os dados obtidos para as primeiras colunas para PCA e PLS-DA (normalização pelo quantil/centrar na média) foram idênticos aos dados obtidos na guia Normalização pelo quantil (Tabela 26) indicando que não é necessário fazer esse tipo de interação. Os dados obtidos em sPLS-DA e orthoPLSDA foram ligeiramente iguais, respectivamente 36,8% e 41,7%, em

todos os tratamentos indicados na Tabela 28, sugerindo não sofrer interferência dos pré-processamentos aplicados. Isso indica que, para estes métodos, não há melhoria de desempenho significativo ao fazer a junção de pré-processamentos.

A Figura 55 apresenta o *biplot* entre PC1 e PC2 da PCA no modo negativo. O gráfico bidimensional mostra a relação entre as duas componentes principais (PC1 e PC2) e sua contribuição na distribuição das amostras, indicando uma separação das classes de arroz (branco e contaminado) no sentido da PC1.

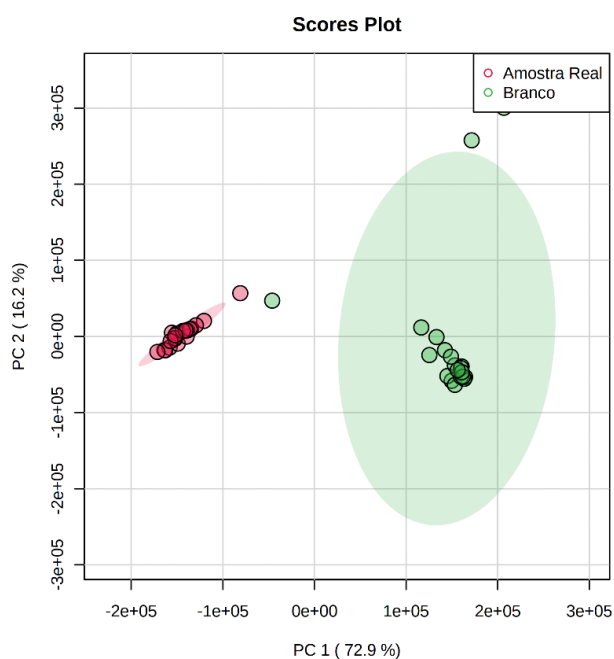
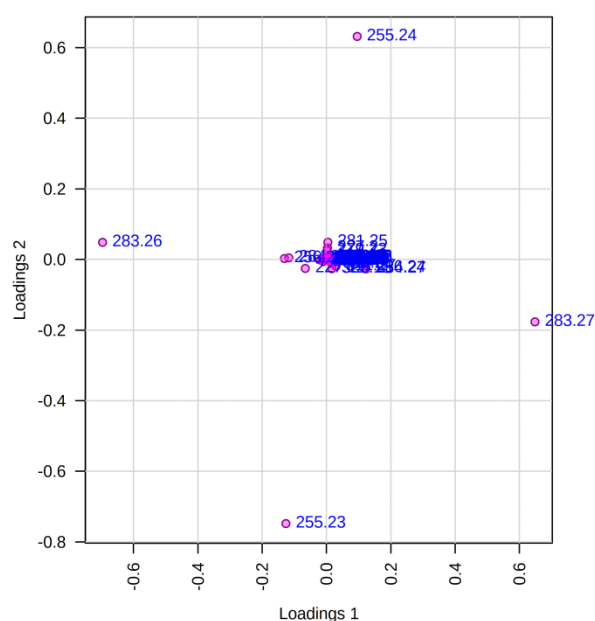


Figura 55. Gráfico de escores 2D – ESI(-) para amostras de arroz.

A Figura 56 apresenta o gráfico de *loadings* no qual indicam quais valores de m/z difere um grupo do outro.



Os íons 255.23, 255.34, 283.26 e 286.27 Da são significativos para diferenciação dos grupos que diferem um grupo de outro, ou seja, as amostras sem/com contaminantes. Entretanto, até o momento não foi possível realizar uma anotação química desses íons moleculares, os quais serão futuramente anotados em posterior estudo a partir de análises de espectrometria de massas de alta resolução e perfil de fragmentação MS/MS. Uma Análise Hierárquica de cluster (do inglês, *Hierarchical cluster analysis* (HCA)) foi realizada a partir dos scores da PCA. A Figura 57 apresenta o dendograma de agrupamento hierárquico das 40 amostras de arroz para o modo ESI(-).

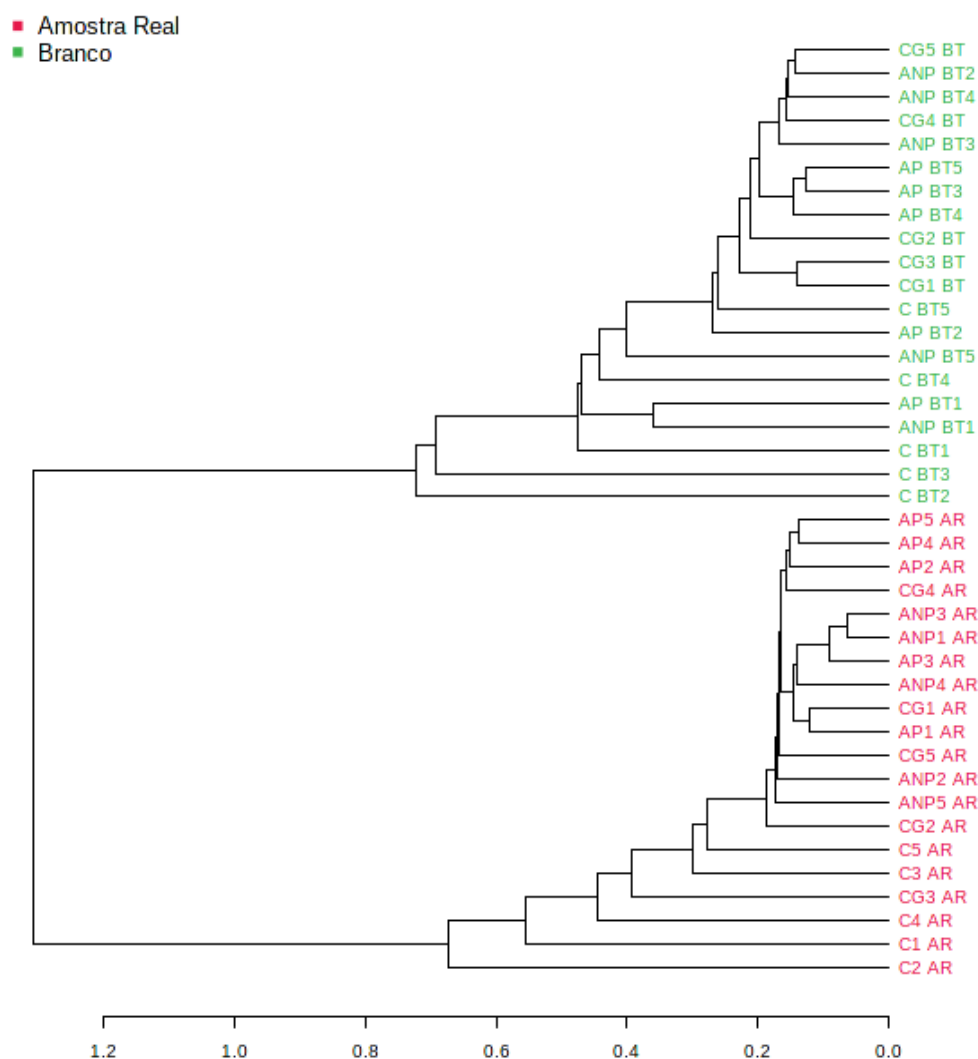


Figura 57. Dendrograma para amostras de arroz – ESI(-).

O ajuste foi pela medida da distância de Spearman. Pelo dendrograma obtido é possível perceber a diferenciação das amostras com contaminante e sem contaminante. Quanto maior o número na escala do dendrograma, maior a dissimilaridade (diferença) que separa os grupos. O índice de dissimilaridade para estes experimentos está entre 0,6 - 0,8. Este índice sugere que existe uma considerável variação ou diferença nas características analisadas entre as amostras. No dendrograma, os ramos mais longos representam maior dissimilaridade, a separação entre os grupos pode ser observada. Grupos distintos sugerem que há um padrão nas amostras, e o método de *clustering* conseguiu agrupar as amostras de acordo com essa dissimilaridade.

Em modo positivo (ESI+), foram utilizadas 40 amostras em um total de 8674 picos excluídos os picos similares, ou também chamados de valores ausentes. A Tabela 29 apresenta os valores obtidos na análise quimiométrica no modo ESI(+) para as diferentes matrizes.

Tabela 29. Valores obtidos nos eixos principais (PC1 e PC2) para a análise quimiométrica em modo ESI(+).

	Sem normalização		Normalização pela soma		Normalização pela mediana		Normalização pelo quantil	
	PC1(%)	PC2(%)	PC1(%)	PC2(%)	PC1(%)	PC2(%)	PC1(%)	PC2(%)
Análise Quimiométrica								
PCA	63,5	11,3	63,5	13,2	62,2	14,1	63,6	7,5
PLS-DA	62,3	11,5	61,3	14,0	59,4	16,5	66,2	5,9
sPLS-DA	15,9	2,9	16,8	4,0	10,9	3,2	16,9	4,8
orthoPLS-DA*	14,4	12,0	14,0	12,5	9,4	8,8	13,6	12,9

*T Score

Para o tratamento de dados, as variâncias são melhores explicadas pela as componentes principais da PCA (sem normalização, 74,8%, normalização pela soma, 76,7%, normalização pela mediana, 76,3%) e PLS-DA (sem normalização, 73,8%, normalização pela soma, 75,3%, normalização pela mediana, 75,9%). Estes dados sugerem que a escolha da normalização pode ter um impacto significativo nos resultados da análise. É possível realizar ainda a junção dos pré-processamentos. Como os tratamentos Normalização pela soma e Normalização pela mediana indicaram os maiores índices (no caso da PCA), foi realizada a interação destes processamentos com as diferentes formas de escalonamento (centrar na média, autoescalar, escalar pelo Pareto, escalar pelo intervalo). A Tabela 30 apresenta os dados obtidos da análise quimiométrica dos dados Normalização pela soma interagindo com as diferentes formas de escalonamento.

Tabela 30. Junção do pré-processamento Normalização pela soma com as diferentes formas de escalonamento – ESI(+).

Análise Quimiométrica	Normalização pela soma / Centrar na média		Normalização pela soma / Autoescalar		Normalização pela soma / Escalar pelo Pareto		Normalização pela soma / Escalar pelo intervalo	
	PC1(%)	PC2(%)	PC1(%)	PC2(%)	PC1(%)	PC2(%)	PC1(%)	PC2(%)
PCA	61,2	12,5	21,8	9,2	41,8	9,6	24,2	10,4
PLS-DA	62,0	14,0	21,1	5,8	41,4	5,7	23,6	6,1
sPLS-DA	16,9	3,5	16,9	5,2	16,9	5,2	16,9	5,2
orthoPLS-DA*	13,9	12,5	13,9	12,5	13,9	12,5	13,9	12,5

*T Score

Os dados obtidos para a interação Normalização pela soma e Centrar na média em PLS-DA (76%) foram os que melhor indicaram a resposta das componentes principais quando se compara as interações da Tabela 30. Este valor obtido foi próximo ao obtido nos dados da Tabela 29. Os dados obtidos em sPLS-DA e orthoPLSDA foram iguais em todos os tratamentos indicados na Tabela 30, com exceção da PC2 em Centrar na Média. A Tabela 31 apresenta os dados obtidos da análise quimiométrica dos dados Normalização pela mediana interagindo com as diferentes formas de escalonamento.

Tabela 31. Junção do pré-processamento Normalização pela mediana com as diferentes formas de escalonamento – ESI(+).

Análise Quimiométrica	Normalização pela mediana / Centrar na média		Normalização pela mediana / Autoescalar		Normalização pela mediana / Escalar pelo Pareto		Normalização pela mediana / Escalar pelo intervalo	
	PC1(%)	PC2(%)	PC1(%)	PC2(%)	PC1(%)	PC2(%)	PC1(%)	PC2(%)
PCA	68,9	15,3	21,5	8,8	38,9	15,3	23,9	8,7
PLS-DA	59,6	24,4	20,9	5,4	38,0	12,4	23,4	5,5
sPLS-DA	16,8	5,5	16,8	5,5	16,8	5,5	16,8	5,5
orthoPLS-DA*	12,6	12,9	12,6	12,9	12,6	12,9	12,6	12,9

*T Score

Os dados obtidos em Normalização pela mediana e Centrar na média pela PCA (84,2%) e PLS-DA (84%) foram os que melhor indicaram a resposta das componentes principais

quando se compara as interações da Tabela 31 e frente aos dados das tabelas anteriores para o estudo das amostras no modo positivo. Os dados obtidos em sPLS-DA (22,3% em todas as formas de escalonamento) e orthoPLSDA (25,5% em todas as formas de escalonamento) foram iguais em todos os tratamentos indicados na Tabela 31.

A Figura 58 apresenta o gráfico bidimensional da PCA (Normalização pela mediana e Centrar na média) no modo positivo.

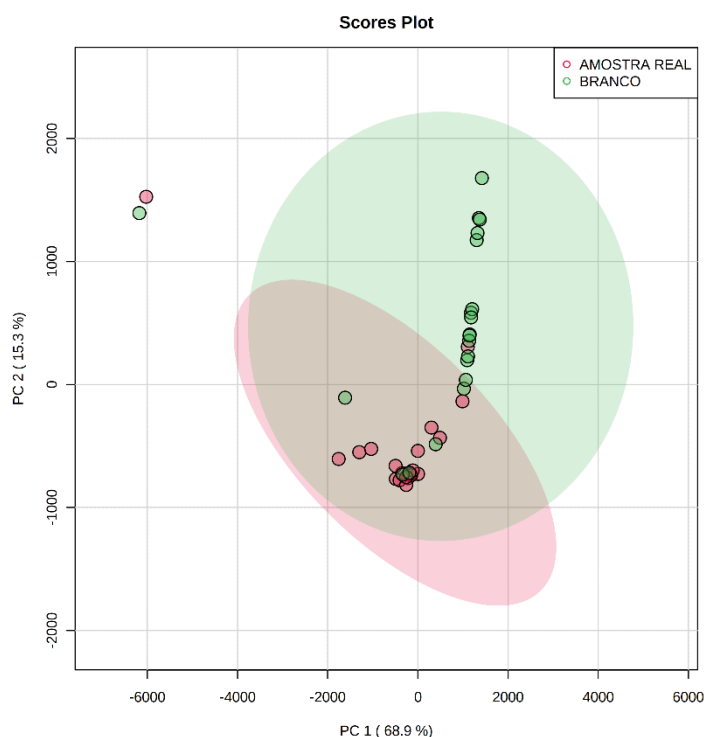


Figura 58. Gráfico de escores 2D – ESI(+).

Pode-se observar a sobreposição das classes, indicando pouca eficiência do algoritmo na classificação das amostras. Neste caso, para o modo positivo, a análise não foi satisfatória, pois não foi possível separar as amostras contaminadas das não contaminadas com os íons identificados.

A Figura 59 apresenta o gráfico de *loadings* no qual indicam quais valores de *m/z* difere um grupo do outro.

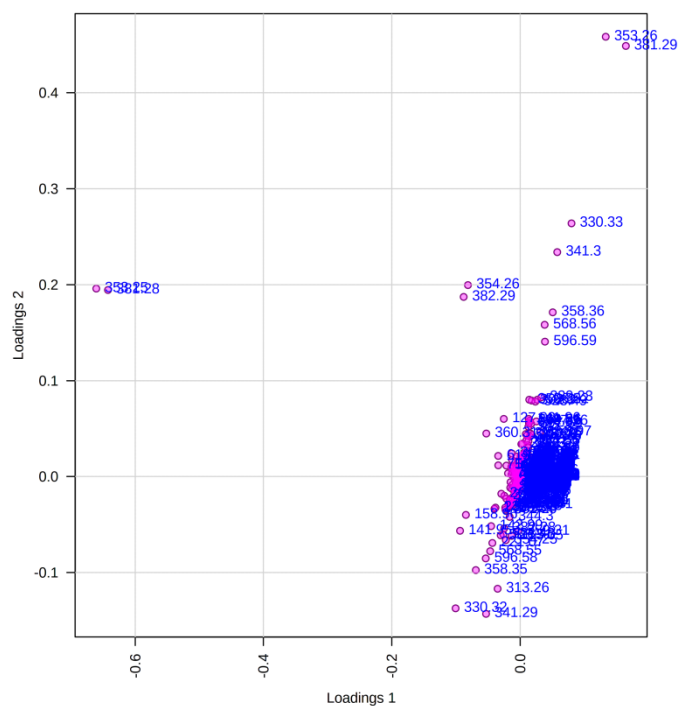


Figura 59. Gráfico de loadings – ESI(+).

Os íons 330.33; 341.3; 353.25; 354.26; 358.36; 381.28; 382.29; 568.56; 596.59 são os que diferem um grupo de outro, ou seja, as amostras sem/com contaminantes.

Como os modelos 2D não explicaram a diferença entre os grupos, realizou-se a análise através dos gráficos 3D. A Figura 60 apresenta os gráficos tridimensionais da PCA no modo positivo.

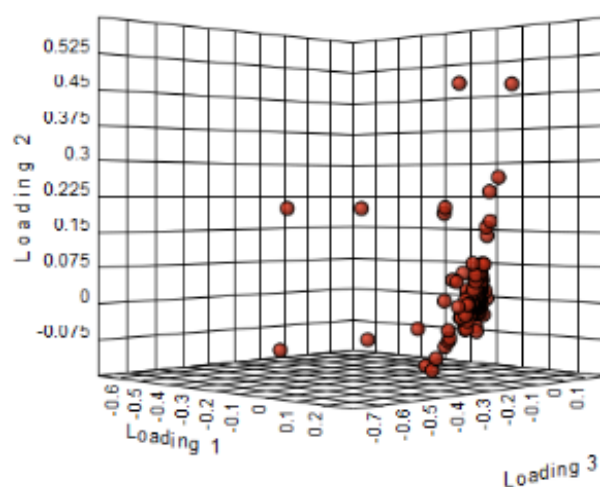
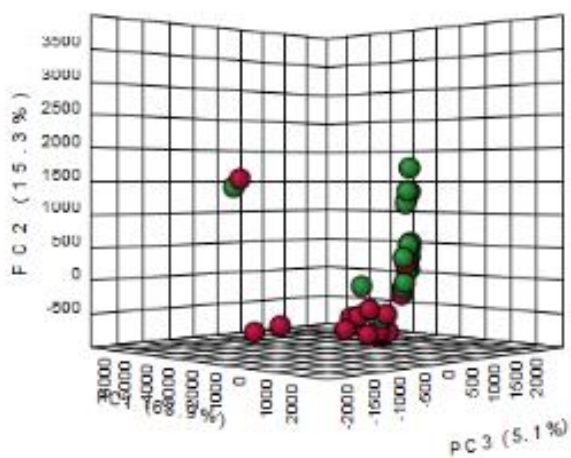


Figura 60. Gráfico 3D sincronizado – ESI(+).

O gráfico tridimensional mostra a relação entre PC1xPC2xPC3. A PC3 não apresenta valor significativo (5,1%). A Figura 60(B) apresenta o gráfico de *loadings* em três dimensões.

A Figura 61 apresenta o gráfico *biplot* que representa as variáveis com eixos calibrados e observações como pontos que permitem projetar as observações nos eixos para fazer uma aproximação dos valores originais das variáveis.

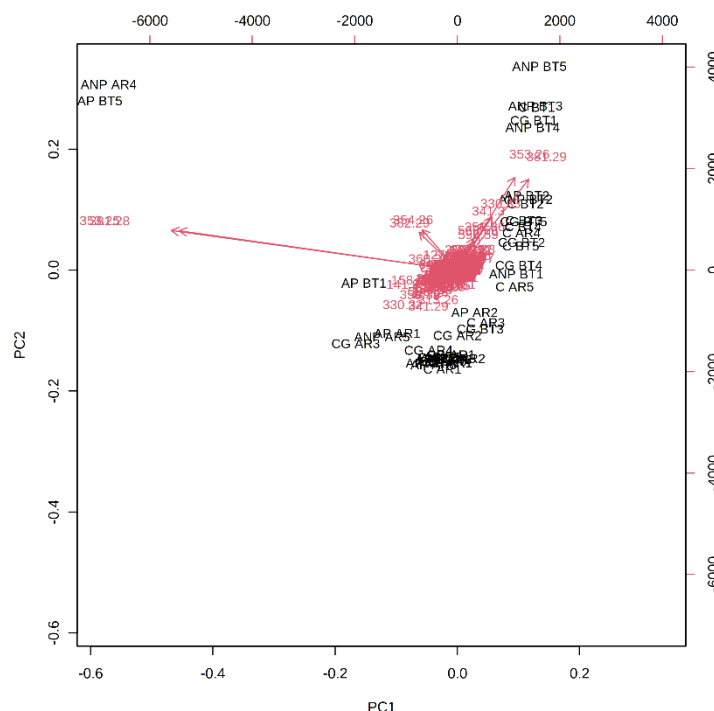


Figura 61. Gráfico biplot – ESI(+).

O gráfico *biplot* representa as variáveis em um espaço bidimensional, onde os eixos são calibrados e as observações são representadas como pontos. As escalas dos eixos são usadas para interpretar a relação entre as variáveis e observações. As setas representam as variáveis originais no espaço *biplot*. A direção e comprimento das setas indicam a direção e magnitude das mudanças nas variáveis. Os pontos representam as amostras. O *biplot* permite a interpretação visual dos padrões, relações e similaridades entre as variáveis e observações. Na Figura 61, não é possível identificar padrões, relações ou similaridade entre as variáveis e observações.

A Figura 62 apresenta o dendograma de agrupamento hierárquico das 40 amostras de arroz para o modo ESI(+).

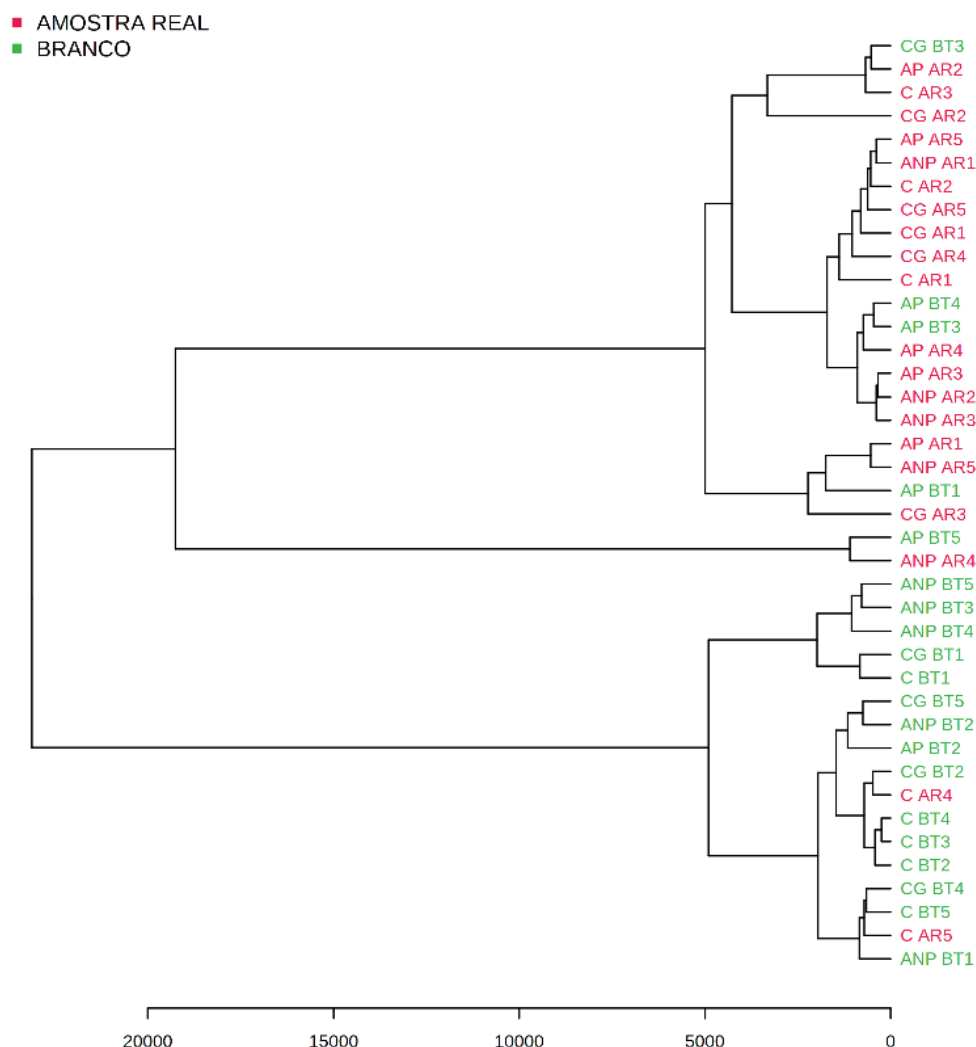


Figura 62. Dendrograma para amostras de arroz – ESI(+).

O melhor ajuste para este pré-processamento foi a Medida da distância por *Euclidian* e o *Clustering Algorithm* do tipo *Ward*. Pelo dendrograma obtido é possível perceber a diferenciação das amostras com contaminante e sem contaminante, mas algumas amostras não se diferenciam (4 entre elas). O índice de dissimilaridade para estes experimentos está entre aproximadamente 20000-5000. Para o modo negativo, o índice de dissimilaridade está entre 0,6-0,8 indicando que os grupos no dendrograma estão moderadamente a bastantebastantes diferentes entre si. Usando a distância de Spearman, a dissimilaridade entre as observações é calculada com base nas correlações de postos entre elas. No modo positivo, a escala se apresenta maior, pois utilizou-se utilizou métrica diferentes na

análisemétrica diferente na análise. O uso da distância Euclidiana e do algoritmo de *clustering* do tipo *Ward* implica em uma abordagem diferente. A distância Euclidiana é uma métrica comum para dados contínuos, medindo a distância direta entre pontos em um espaço euclidiano. O algoritmo de *Ward* visa formar clusters que minimizam a soma dos quadrados dos desvios dentro de cada cluster. Isso pode resultar em dissimilaridades que variam em uma escala maior, especialmente se houver muita variação nos dados.

Com estes resultados é possível afirmar que o modo negativo explica melhor a diferenciação entre os grupos das amostras de arroz contaminado e não contaminado. Pois se percebe que os métodos de pré-processamento ou normalização levam a uma melhoria notável nos resultados.

A literatura reporta o uso de ferramentas quimiométricas na análise de pesticidas em arroz e outras matrizes alimentares. A seguir, serão descritas algumas pesquisas envolvendo arroz e outros vegetais utilizando técnicas de detecção e análises quimiométricas distintas.

Wan et al. (2023), desenvolveram um método de triagem rápida de resíduos de bensulfuram metial, propanil e cirpemetrina no arroz, abordando problemas como interferência da matriz e demora na detecção. Os pesquisadores realizaram um pré-tratamento da amostra utilizando o método QuEChERS adaptado e a detecção por espectroscopia UV. A precisão obtida foi superior a 90% utilizando a máquina de suporte de vetores (ou do inglês *Support Vector Machine*, SVM) e erro menor que 5,36% através da regressão de mínimos quadrados parciais (WAN et al., 2023).

Jiang et al. (2021), quantificaram clorpirifós em amostras de arroz utilizando a espectroscopia Raman com amplificação de superfície (SERS) através de modelos de algoritmos quimiométricos sendo o de melhor predição o modelo competitivo adaptativo de amostragem reponderada de mínimos quadrados parciais com um limite de detecção de 0,01 µg/mL. Os resultados do teste t de Student não mostraram diferença significativa entre o método SERS e a HPLC, e um bom desvio padrão relativo (RSD) indicou que este método poderia ser usado para a detecção de clorpirifós em arroz (JIANG et al., 2021).

Zhang et al. (2023), utilizaram a espectroscopia Raman (SERS) mas os autores afirmam que um único método de análise não pode satisfazer o estudo de sistemas complexos. O grupo desenvolveu um sensor bioquímico para reconhecimento do clorpirifós empregando aptâmeros imobilizados na superfície do sensor. O modelo PLS é aplicado na análise de dados espectrais para resolver problemas de interferência para que o aptâmero

desenvolvido possa alcançar uma análise quantitativa totalmente seletiva. O modelo possui alta exatidão e precisão na detecção de resíduos de clorpirifós em amostras de arroz e maçã (ZHANG et al., 2023).

Xiao et al. (2021) desenvolveram um método de perfil metabólico para amostras de arroz orgânico e convencional. Utilizaram as técnicas de UPLC-QTOF em combinação com análises estatísticas multivariadas como: PCA, PLS-DA, HCA (análise de agrupamento hierárquico) para determinar padrões metabólicos entre as amostras de arroz. Utilizaram ainda a OPLS-DA para identificar os principais constituintes que permitiram distinguir eficientemente os métodos de cultivo. Foram escolhidos 30 componentes discriminantes dos dois tipos de arroz, nos quais 8 metabólitos secundários poderiam ser considerados potenciais biomarcadores para a discriminação de arroz orgânico e convencional (XIAO et al., 2018).

Lv et al. (2024) fazem uma abordagem interessante sobre a investigação de resíduos de pesticidas *in-situ* na matriz líquida (em solvente) como comumente é analisada. Este estudo utilizou a espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (ATR-FTIR) para caracterização de resíduo de fungicida (boscalide) de amplo espectro em superfície de plantas de tomate. Nessa análise não utilizaram qualquer tipo de pré-tratamento no vegetal e os espectros obtidos foram processados por métodos quimiométricos. Utilizaram a rede neural probabilística (PNN) acoplada a PCA obtendo uma precisão de 93,33% para o modelo de classificação. Segundo os pesquisadores, o modelo de regressão, estabelecido por meio de regressão PLSR, demonstrou desempenho excepcional com valor de R^2 de 0,80, RMSE de 1,02 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, RPD de 2,0 e RPIQ de 2,1 para validação (LV et al., 2024).

O presente trabalho se destaca por sua abordagem na análise de amostras de arroz contaminadas ou não por fungicidas. Os estudos mencionados anteriormente empregam técnicas como espectroscopia UV, espectroscopia Raman, cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. No entanto, o presente estudo utiliza a abordagem da infusão direta com ionização por electrospray seguida da análise por espectrometria de massas. Foram aplicados métodos quimiométricos para o tratamento dos dados, permitindo uma análise mais detalhada e precisa das informações obtidas.

Através dos dados exibidos neste estudo é possível verificar que a espectrometria de massas é uma ferramenta potencial para avaliar a contaminação de amostras de arroz, quando associada às ferramentas quimiométricas. Isto sugere uma aplicação nobre para controle de qualidade de produtos ditos “orgânicos”, ou seja, isento de aditivos químicos como

pesticidas. A legislação Brasileira ainda é excipiente para a fiscalização e controle destes produtores, mas o mercado de produtos orgânicos encontra-se em plena ascensão o que seria de grande interesse social e financeiro, tanto para sociedade quanto para o produtor.

5 - Conclusão

Foram analisadas quatro matrizes distintas em ambos os grupos (arroz contaminado e não contaminado). De um total de 80 amostras (40 para cada modo – negativo e positivo), os picos excluídos no modo ESI(-) foram 8123 e no modo ESI(+) foram 8674. Para ambos os modos foram obtidos valores de variância explicada para PC1 e PC2 para a análise quimiométrica.

No modo ESI(-), os dados foram melhores explicados pela PCA Sem Normalização como a forma de escalonamento centrar na média onde se explica 89,1% dos dados e também pela Normalização pelo quantil com a forma de escalonamento centrar na média onde se explica 90% dos dados. No gráfico *biplot* foi possível visualizar a separação dos grupos das amostras contaminadas e não contaminadas indicando que o processamento em 2D é suficiente. Os íons 255.23, 255.34, 283.26 e 286.27 são os que diferem um grupo de outro, ou seja, as amostras sem/com contaminantes. Entretanto, até o momento não foi possível realizar uma anotação química desses íons moleculares, os quais serão futuramente anotados em posterior estudo a partir de análises de espectrometria de massas de alta resolução e perfil de fragmentação MS/MS. Pelo dendograma, o ajuste foi feito pela medida da distância de Spearman obtendo índice de dissimilaridade entre 0,6-0,8. Grupos distintos sugerem que há um padrão nas amostras, e o método de *clustering* conseguiu agrupar as amostras de acordo com essa dissimilaridade.

No modo ESI(+), os dados são melhores explicados pelas componentes principais da PCA (sem normalização, 74,8%, normalização pela soma, 76,7%, normalização pela mediana, 76,3%) e PLS-DA (sem normalização, 73,8%, normalização pela soma, 75,3%, normalização pela mediana, 75,9%). Neste caso, a escolha da normalização pode ter um resultado significativo na análise. Foram realizadas a junção dos pré-processamentos com as diferentes formas de escalonamento. Para a interação normalização pela soma e centrar na média, a PCA, 73,7% dos dados foram explicados com essa interação e para a PLS-DA o resultado foi de 76% com a mesma interação. Para a interação Normalização pela mediana e centrar na média foram obtidos 84,2% dos dados explicados pela PCA e para PLS-DA, 84%. Na análise bidimensional, não foi possível separar os grupos das amostras contaminadas e não contaminadas. Foi necessário realizar a análise 3D e a PC3 apresentou baixo valor significativo para a análise (5,1%). Pelo dendograma, também não foi possível separar os dois

grupos de amostras (contaminadas em não contaminadas). Quatro amostras não apresentaram diferenciação neste modo de análise. O melhor ajuste para o pré-processamento dos dados em modo ESI(+) foram a medida da distância por Euclidian e o Clustering Algorithm do tipo Ward obtendo valor de dissimilaridade entre 20000-5000.

O modo negativo explica melhor a dissimilaridade entre os grupos das amostras de arroz contaminado e não contaminado.

Este estudo destaca a eficácia da espectrometria de massas associadas aos métodos quimiométricos na análise de amostras de arroz contaminadas (ou não) por fungicidas. A utilização desta abordagem proporcionou uma análise mais detalhada e precisa das amostras, oferecendo um maior entendimento sobre essas matrizes complexas. É evidente a necessidade de um maior desenvolvimento e aplicações de técnicas analíticas distintas na análise de pesticidas em alimentos, juntamente com uma regulamentação mais rigorosa, para garantir a segurança alimentar e atender às demandas crescentes do mercado por produtos “livres” de pesticidas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Os estudos abordados neste trabalho revelam a importância de desenvolver e aprimorar métodos analíticos para avaliar a presença de substâncias nocivas em alimentos, contribuindo assim para a segurança alimentar e a saúde pública. A análise de antibióticos em leite, a quantificação de bisfenóis em embalagens e leite UHT, a investigação de agroquímicos em amostras complexas e a análise de arroz contaminado por fungicidas demonstram a diversidade de desafios enfrentados no controle de qualidade dos alimentos.

Os resultados obtidos evidenciam que a cromatografia líquida, a espectrometria de massas aliada a métodos quimiométricos, podem ser ferramentas eficazes na detecção e quantificação de contaminantes em diferentes matrizes alimentares. No entanto, é fundamental destacar a necessidade contínua de desenvolver novas técnicas analíticas e de aprimorar os métodos existentes para garantir a segurança dos alimentos.

As perspectivas incluem a investigação de novos contaminantes emergentes, o aprimoramento das técnicas de análise para aumentar a sensibilidade e seletividade, bem como o desenvolvimento de métodos mais rápidos e econômicos para análise de alimentos. Além disso, é importante promover uma regulamentação mais rigorosa e uma maior conscientização sobre os riscos associados aos contaminantes alimentares, visando garantir a proteção da saúde pública e o fornecimento de alimentos seguros e de alta qualidade para a população.

No Capítulo 1, algumas perspectivas podem ser detalhadas como: 1) o aprimoramento do método analítico de extração para torná-lo ainda mais sensível, seletivo e robusto. Isso pode envolver otimização das condições experimentais, avaliação de solventes distintos ou outros métodos de preparo de amostra; 2) a ampliação do escopo de análise. Isso inclui a investigação de outros antibióticos presentes no leite abrangendo a pesquisa sobre segurança do alimento; 3) estudos de farmacocinética e metabolismo. Isso inclui a identificação e caracterização dos metabólitos formados. Em resumo, o trabalho atual estabeleceu uma base sólida para as pesquisas futuras e aplicações práticas na investigação de antibiótico em leite.

No Capítulo 2, a perspectiva é continuar desenvolvendo e aprimorando métodos analíticos para detecção e quantificação de bisfenóis e outros compostos em embalagens de alimentos distintos. O uso da espectrometria de massas ambiente tem se desenvolvido bastante nos últimos anos e prospecta um aumento do seu uso para diferentes aplicações.

No Capítulo 3, a perspectiva é avaliar outros parâmetros do método proposto como: comprimentos de fibra distintos, outros solventes extratores, aprimorar o sistema trifásico e as condições específicas de pH. E também a aplicação deste método para amostras reais de arroz com a presença de agrotóxicos. O método pode ser utilizado para diversas matrizes distintas e agroquímicos variados.

No Capítulo 4, a perspectiva sugere diversas direções: 1) anotação química dos compostos não identificados. Proceder com análise de espectrometria de massas de alta resolução e perfil de fragmentação (MS/MS) para identificação precisa dos compostos; 2) otimização das técnicas de pré-processamento e escalonamento utilizando o método ESI(-), para refinamento da análise quimiométrica e melhor diferenciação entre amostras contaminadas e não contaminadas; 3) aplicação de outras técnicas analíticas como a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas para melhor compreensão dos dados obtidos das amostras de arroz contaminadas por fungicidas; 4) aplicação do estudo quimiométrico em diferentes tipos de amostras. Isso amplia o escopo de aplicação do método e sua relevância para a segurança alimentar.

Em resumo, este trabalho fornece uma visão abrangente de pesquisas na análise de contaminantes em alimentos, abordando desde antibióticos, bisfenóis em leite até agrotóxicos em arroz. Cada capítulo apresenta uma contribuição para a química analítica e segurança alimentar, destacando a importância da pesquisa contínua e do desenvolvimento de métodos analíticos variados. As perspectivas apontam para uma melhoria dos métodos existentes, exploração de novas técnicas e ampliação do escopo de análise. Essas perspectivas contribuirão para uma compreensão mais aprofundada dos contaminantes alimentares e no auxílio da melhoria da qualidade dos alimentos que a população consome. Este trabalho encerra uma etapa de investigação, mas lança bases para futuras pesquisas da química analítica e sua aplicação para a saúde pública.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. **Monografias de agrotóxicos**. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/acessoainformacao/dadosabertos/informacoes-analiticas/monografias-de-agrotoxicos>>.

Acesso em: 19 fev. 2024.

BAEZA, A. N. et al. Multiresidue analysis of cephalosporin antibiotics in bovine milk based on molecularly imprinted polymer extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1474, p. 121–129, 2016.

BARBOSA, A. M. J. et al. A new indirect method based on square-wave voltammetry for ceftiofur determination in bovine milk using an alkaline degradation product. **Microchemical Journal**, v. 98, n. 2, p. 297–302, jul. 2011.

BARRIONUEVO, W. R.; LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida (SPE) e micro-extração em fase sólida (SPME) de piretróides em água**Artigo Quim. Nova. [s.l: s.n.].

BASTOS, L. et al. Integrative Approach Based on Simplex-Centroid Design, ESI-MS and Chemometric Analysis for Comprehensive Characterization of Phenolic Compounds from *Endopleura uchi* Bark. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2020.

BASURI, P.; BAIDYA, A.; PRADEEP, T. Sub-Parts-per-Trillion Level Detection of Analytes by Superhydrophobic Preconcentration Paper Spray Ionization Mass Spectrometry (SHPPSI MS). **Analytical Chemistry**, v. 91, n. 11, p. 7118–7124, 4 jun. 2019.

BEMRAH, N. et al. Assessment of dietary exposure to bisphenol A in the French population with a special focus on risk characterisation for pregnant French women. **Food and Chemical Toxicology**, v. 72, p. 90–97, out. 2014.

BERNASCONI, C. et al. Evidence for soil pesticide contamination of an agroecological farm from a neighboring chemical-based production system. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 313, p. 107341, 15 jun. 2021.

BJÖRNSDOTTER, M. K.; DE BOER, J.; BALLESTEROS-GÓMEZ, A. **Bisphenol A and replacements in thermal paper: A review**. **Chemosphere**Elsevier Ltd, , 2017.

BLANCO-ZUBIAGUIRRE, L. et al. Target and suspect screening of substances liable to migrate from food contact paper and cardboard materials using liquid chromatography-high resolution tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 208, 1 fev. 2020.

BORDIN, L. C. et al. Efeito da aplicação de fungicidas no controle de doenças foliares de arroz irrigado e sua relação com o rendimento industrial. **Summa Phytopathologica**, v. 42, n. 1, p. 85–88, mar. 2016.

CALDAS, S. S. et al. 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.

CAO, X.-L.; POPOVIC, S. Solid phase extraction of large volume of water and beverage samples to improve detection limits for GC-MS analysis of bisphenol A and four other bisphenols. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 35, n. 1, p. 49–55, 2 jan. 2018.

CHA, Y. B. S.-W. Determination of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Human Urine Sample using HPLC/UV and Three Phase Hollow Fiber-Liquid Phase Microextraction (HF-LPME). **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 34, n. 11, p. 3444–3450, 20 nov. 2013.

CHEMICALIZE - INSTANT CHEMINFORMATICS SOLUTIONS. **Ceftiofur**.

CHEMSAFETY PRO. **Food Contact Science and Testing: What are OML, SML and QM?**

CHEN, L. C. et al. Application of Probe Electrospray Ionization for Biological Samples Measurements. **Environment control in biology**, v. 47, n. 2, p. 73–86, 2009.

CHEN, X.; YE, N. Graphene Oxide-Reinforced Hollow Fiber Solid-Phase Microextraction Coupled with High-Performance Liquid Chromatography for the Determination of Cephalosporins in Milk Samples. **Food Analytical Methods**, v. 9, n. 9, p. 2452–2462, 1 set. 2016.

CHEN, Y. et al. Persistence, mobility, and leaching risk of flumioxazin in four Chinese soils. **Journal of Soils and Sediments 2021 21:4**, v. 21, n. 4, p. 1743–1754, 18 fev. 2021.

CHENG, G. et al. A highly sensitive and selective method for the determination of ceftiofur sodium in milk and animal-origin food based on molecularly imprinted solid-phase extraction coupled with HPLC-UV. **Food Chemistry**, v. 347, 15 jun. 2021.

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, 2008a.

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, 2008b.

CLARKE, K. R.; SOMERFIELD, P. J.; GORLEY, R. N. Clustering in non-parametric multivariate analyses. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 483, p. 147–155, out. 2016.

COLAZZO, M. et al. Multi-residue method for trace pesticide analysis in soils by LC-QQQ-MS/MS and its application to real samples. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 98, n. 14, p. 1292–1308, 14 nov. 2018.

CONAB, C. N. DE A. **Boletim da Safra de Grãos: 12º Levantamento - Safra 2022/23**.

COOKS, R. G. et al. Ambient mass spectrometry. **Science**, v. 311, n. 5767, p. 1566–1570, 2006.

CRISTINA, M. et al. Uso de ceftiofur em vacas leiteiras e sua excreção no leite. **PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 4, n. 138, p. 1–11, 2010.

DA COSTA MARINHO, M. I. et al. Validation and application of a QuEChERS based method for estimation of half-life of imidazolinone herbicides in soils by LC-ESI-MS/MS. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 167, p. 212–217, jan. 2019.

DENG, J. et al. Slug-flow microextraction coupled with paper spray mass spectrometry for rapid analysis of complex samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 940, p. 143–149, out. 2016.

DI STEFANO, V. et al. **Applications of liquid chromatography-mass spectrometry for food analysis**. **Journal of Chromatography A** Elsevier B.V., , 12 out. 2012.

DING, W. et al. Preconcentration/extraction of trace bisphenols in milks using a novel effervescent reaction-assisted dispersive solid-phase extraction based on magnetic nickel-based N-doped graphene tubes. **Microchemical Journal**, v. 150, p. 104109, nov. 2019.

DIONÍSIO, A. G. G. et al. Novas Tendências em Preparo de Amostras para Cromatografia Líquida. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 3, p. 19–29, 2010.

DORIVAL-GARCÍA, N. et al. Simultaneous determination of quinolone and β -lactam residues in raw cow milk samples using ultrasound-assisted extraction and dispersive-SPE prior to UHPLC-MS/MS analysis. **Food Control**, v. 60, p. 382–393, 1 fev. 2016.

DUALDE, P. et al. Determination of four parabens and bisphenols A, F and S in human breast milk using QuEChERS and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 1114–1115, p. 154–166, maio 2019a.

DUALDE, P. et al. Biomonitoring of bisphenols A, F, S in human milk and probabilistic risk assessment for breastfed infants. **Science of the Total Environment**, v. 668, p. 797–805, 10 jun. 2019b.

ECOLIFE TETRA-PAK. **Composição**. Disponível em: <<https://ecolifetetrapak.wordpress.com/reciclagem/>>. Acesso em: 11 set. 2023.

EFSA. **Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos**. Disponível em: <<https://www.efsa.europa.eu/pt>>. Acesso em: 6 out. 2023.

EFSA, E. F. S. A. **Assessment of new information on Bisphenol S (BPS) submitted in response to the Decision under REACH Regulation (EC) No 1907/2006**. . EFSA supporting publication 2020:EN-1844, 2020., 2020.

ELLIS, D. I. et al. Fingerprinting food: Current technologies for the detection of food adulteration and contamination. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 17, p. 5706–5727, 6 ago. 2012.

EMBRAPA. **Anuário Leite 2022**. [s.l: s.n.].

EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. **Dados de conjuntura da produção de arroz (Oryza sativa L.) no Brasil (1985-2018): área, produção e rendimento**. .

EPA. **Clomazone Summary Document: Registration Review**. https://archive.epa.gov/oppsrrd1/registration_review/web/pdf/clomazone_summary.pdf, 2007.

ESPY, R. D. et al. Spray mechanism in paper spray ionization. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 325–327, p. 167–171, 1 jul. 2012.

EU, E. U. **Commission Regulation (EU) 2018/213**. **Official Journal of the European Union**.

FAO. The State of Food Security and Nutrition in the World 2023. 12 jul. 2023.

FAO; IFAD; UNICEF; WFP; WHO. **The State of Food Security and Nutrition in the World 2023**. [s.l.] FAO; IFAD; UNICEF; WFP; WHO;, 2023.

FASANO, E. et al. Migration of phthalates, alkylphenols, bisphenol A and di(2-ethylhexyl)adipate from food packaging. **Food Control**, v. 27, n. 1, p. 132–138, set. 2012.

FDA. **US Food & Drug Administration**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/>>. Acesso em: 6 out. 2023.

FENOLL, J. et al. Trace analysis of sulfonylurea herbicides in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 101, p. 273–282, 15 nov. 2012.

FERREIRA, D. et al. PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS (PCA) PARA A AVALIAÇÃO DE DADOS QUÍMICOS E GERAÇÃO DE HEAT MAPS: UM TUTORIAL. **Química Nova**, 2023.

FERREIRA, M. M. C. et al. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p. 724–731, set. 1999.

FERRER, E. et al. Simultaneous determination of bisphenol A, octylphenol, and nonylphenol by pressurised liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry in powdered milk and infant formulas. **Food Chemistry**, v. 126, n. 1, p. 360–367, maio 2011.

FILIPPOU, O.; DELIYANNI, E. A.; SAMANIDOU, V. F. Fabrication and evaluation of magnetic activated carbon as adsorbent for ultrasonic assisted magnetic solid phase dispersive extraction of bisphenol A from milk prior to high performance liquid chromatographic analysis with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1479, p. 20–31, jan. 2017.

GARCÍA-CÓRCOLES, M. T. et al. Determination of bisphenols with estrogenic activity in plastic packaged baby food samples using solid-liquid extraction and clean-up with dispersive sorbents followed by gas chromatography tandem mass spectrometry analysis. **Talanta**, v. 178, p. 441–448, 1 fev. 2018.

GEUEKE, B.; GROH, K.; MUNCKE, J. **Food packaging in the circular economy: Overview of chemical safety aspects for commonly used materials**. **Journal of Cleaner Production** Elsevier Ltd, , 20 ago. 2018a.

GEUEKE, B.; GROH, K.; MUNCKE, J. **Food packaging in the circular economy: Overview of chemical safety aspects for commonly used materials**. **Journal of Cleaner Production** Elsevier Ltd, , 20 ago. 2018b.

GONZÁLEZ-CURBELO, M. Á. et al. Determination of organophosphorus pesticides and metabolites in cereal-based baby foods and wheat flour by means of ultrasound-assisted extraction and hollow-fiber liquid-phase microextraction prior to gas chromatography with nitrogen phosphorus detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1313, p. 166–174, 25 out. 2013.

GORDEN, P. J. et al. Altered plasma pharmacokinetics of ceftiofur hydrochloride in cows affected with severe clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 1, p. 505–514, 1 jan. 2016.

GROSS, J. H. **Mass Spectrometry**. 2^a ed. [s.l.] Springer, 2011.

GRUMETTO, L. et al. Determination of Five Bisphenols in Commercial Milk Samples by Liquid Chromatography Coupled to Fluorescence Detection. **Journal of Food Protection**, v. 76, n. 9, p. 1590–1596, set. 2013.

GUETOUCHE et al. Composition and nutritional value of raw milk. **Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research**, v. 2, n. 10, p. 115–122, 2014.

GUILHAUS, M. MASS SPECTROMETRY | Time-of-Flight. Em: **Encyclopedia of Analytical Science**. [s.l.] Elsevier, 2005. p. 412–423.

HAJRULAI-MUSLIU, Z. et al. Multi-class/residue method for determination of veterinary drug residues, mycotoxins and pesticide in urine using LC-MS/MS technique. **BMC Veterinary Research**, v. 19, n. 1, p. 156, 14 set. 2023.

HAN, C.; HONG, Y. C. **Bisphenol A, Hypertension, and Cardiovascular Diseases: Epidemiological, Laboratory, and Clinical Trial Evidence**. **Current Hypertension Reports** Current Medicine Group LLC 1, , 1 fev. 2016.

HAN, R. et al. Elimination kinetics of ceftiofur hydrochloride in milk after an 8-day extended intramammary administration in healthy and infected cows. **PLoS ONE**, v. 12, n. 11, 1 nov. 2017.

HARTIGAN, J. A. Representation of Similarity Matrices by Trees. **Journal of the American Statistical Association**, v. 62, n. 320, p. 1140–1158, dez. 1967.

HECK, A. J. R.; VAN DEN HEUVEL, R. H. H. Investigation of intact protein complexes by mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 23, n. 5, p. 368–389, 15 set. 2004.

HERRERO, L. et al. Plasticisers and preservatives in commercial milk products: A comprehensive study on packages used in the Spanish market. **Food Chemistry**, v. 338, p. 128031, fev. 2021.

HIROOKA, T.; ISHII, H. Chemical control of plant diseases. **Journal of General Plant Pathology**, v. 79, n. 6, p. 390–401, 6 nov. 2013.

HSU, C. C.; DORRESTEIN, P. C. **Visualizing life with ambient mass spectrometry**. **Current Opinion in Biotechnology** Elsevier Ltd, , 2015.

HUANG, T. et al. Human exposure to polychlorinated biphenyls embodied in global fish trade. **Nature Food**, v. 1, n. 5, p. 292–300, 11 maio 2020.

HUANG, Y. Q. et al. Bisphenol A (BPA) in China: A review of sources, environmental levels, and potential human health impacts. **Environment International**, v. 42, n. 1, p. 91–99, 2012.

JADHAV, M. R. et al. A unified approach for high-throughput quantitative analysis of the residues of multi-class veterinary drugs and pesticides in bovine milk using LC-MS/MS and GC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 272, p. 292–305, 30 jan. 2019.

JAMPILEK, J. Potential of agricultural fungicides for antifungal drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2 jan. 2016.

JANK, L. et al. High-throughput method for the determination of residues of β -lactam antibiotics in bovine milk by LC-MS/MS. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 32, n. 12, p. 1992–2001, 2 dez. 2015.

JIANG, L. et al. Rapid detection of chlorpyrifos residue in rice using surface-enhanced Raman scattering coupled with chemometric algorithm. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 261, p. 119996, nov. 2021.

JIMÉNEZ-CARVELO, A. M. et al. PLS-DA vs sparse PLS-DA in food traceability. A case study: Authentication of avocado samples. **Talanta**, v. 224, p. 121904, mar. 2021.

JINGJING, Z.; JIE, J.; XIAOLIN, Q. Development of an ion mobility spectrometer with a paper spray ionization source. **Review of Scientific Instruments**, v. 84, n. 6, jun. 2013.

JUNZA, A. et al. Multiclass method for the determination of quinolones and β -lactams, in raw cow milk using dispersive liquid-liquid microextraction and ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1356, p. 10–22, 22 ago. 2014a.

JUNZA, A. et al. Multiclass method for the determination of quinolones and β -lactams, in raw cow milk using dispersive liquid-liquid microextraction and ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1356, p. 10–22, 22 ago. 2014b.

KANG, J. JUN et al. Elimination of ceftiofur hydrochloride residue in postpartum cows' milk after intramammary infusing at dry-off. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 17, n. 6, p. 1234–1240, 1 jun. 2018.

KARAGEORGOU, E. G.; SAMANIDOU, V. F.; PAPADOYANNIS, I. N. Ultrasound-assisted matrix solid phase dispersive extraction for the simultaneous analysis of β -lactams (four penicillins and eight cephalosporins) in milk by high performance liquid chromatography with photodiode array detection. **Journal of Separation Science**, v. 35, n. 19, p. 2599–2607, out. 2012.

KARAMAN, A. D. et al. Recent Advances in Dairy Packaging. **Food Reviews International**, v. 31, n. 4, p. 295–318, 2 out. 2015.

KARAMIZADEH, S. et al. An Overview of Principal Component Analysis. **Journal of Signal and Information Processing**, v. 04, n. 03, p. 173–175, 2013.

KIM, J. K. et al. Effect of developmental exposure to bisphenol A on steroid hormone and vitamin D3 metabolism. **Chemosphere**, v. 237, 1 dez. 2019.

KOKOSA, J. M. Selecting an extraction solvent for a greener liquid phase microextraction (LPME) mode-based analytical method. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p. 238–247, set. 2019.

KONTOMINAS, M. G. Packaging and the Shelf Life of Milk: Recent Developments. Em: **Reference Module in Food Science**. [s.l.] Elsevier, 2019.

KORANY, M. A. et al. **Green chemistry: Analytical and chromatography**. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies** Taylor and Francis Inc., , 2 out. 2017.

KRAEMER, A. F. et al. Destino ambiental dos herbicidas do grupo das imidazolinonas: revisão. **Planta Daninha**, v. 27, n. 3, p. 629–639, 2009.

KUROWSKA-SUSDORF, A. et al. **Green analytical chemistry: Social dimension and teaching**. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry** Elsevier B.V., , 1 fev. 2019.

LANÇAS, F. M. **Técnicas de Preparo de Amostras**, 2008. (Nota técnica).

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente “compatíveis”? II. A escolha do analisador de massas. **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 1, p. 27–46, 2013.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE**. 2ª ed. Campinas, SP: Átomo, 2016.

LEMOS, A. C. et al. Contaminantes formados durante o processamento de alimentos. **Avanços Em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 1, p. 111–157, 2020.

LESTIDO-CARDAMA, A. et al. Dietary Exposure Estimation to Chemicals Transferred from Milk and Dairy Products Packaging Materials in Spanish Child and Adolescent Population. **Foods**, v. 9, n. 11, p. 1554, 27 out. 2020.

LESTIDO-CARDAMA, A. et al. Study on the chemical behaviour of Bisphenol S during the in vitro gastrointestinal digestion and its bioaccessibility. **Food Chemistry**, v. 367, 15 jan. 2022.

LEWIS, K. A. et al. An international database for pesticide risk assessments and management. **Human and Ecological Risk Assessment**, v. 22, n. 4, p. 1050–1064, 18 maio 2016.

LI, N. et al. Magnetic covalent organic frameworks based on magnetic solid phase extraction for determination of six steroidal and phenolic endocrine disrupting chemicals in food samples. **Microchemical Journal**, v. 143, p. 350–358, dez. 2018.

LIAN, L. et al. Dispersive solid-phase extraction of bisphenols migrated from plastic food packaging materials with cetyltrimethylammonium bromide-intercalated zinc oxide. **Journal of Chromatography A**, v. 1612, p. 460666, fev. 2020.

LIAO, C.; KANNAN, K. Concentrations and Profiles of Bisphenol A and Other Bisphenol Analogues in Foodstuffs from the United States and Their Implications for Human Exposure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 19, p. 4655–4662, 15 maio 2013.

LIAO, C.; KANNAN, K. A survey of bisphenol A and other bisphenol analogues in foodstuffs from nine cities in China. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 31, n. 2, p. 319–329, 30 fev. 2014.

LIM, Y. H. et al. Identification of ceftiofur oxidation products by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization/tandem mass spectrometry. **Mass Spectrometry Letters**, v. 2, n. 1, p. 16–19, 2011.

LIŠKA, I. Fifty years of solid-phase extraction in water analysis – historical development and overview. **Journal of Chromatography A**, v. 885, n. 1–2, p. 3–16, jul. 2000.

LIU, J. et al. Development, characterization, and application of paper spray ionization. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 6, p. 2463–2471, 15 mar. 2010.

LOO, J. A. Electrospray ionization mass spectrometry: a technology for studying noncovalent macromolecular complexes. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 200, n. 1–3, p. 175–186, dez. 2000.

LORBER, M. et al. Exposure assessment of adult intake of bisphenol A (BPA) with emphasis on canned food dietary exposures. **Environment International**, v. 77, p. 55–62, abr. 2015.

LUCAS, J. et al. USOS, EFEITOS E POTENCIAL TÓXICO DOS AGROTÓXICOS NA QUALIDADE DO SOLO. [s.d.].

LUIZ, A. L.; MACIEL, E. V. S.; LANÇAS, F. M. Uma abordagem conceitual das técnicas miniaturizadas de preparo de amostra e suas aplicações na análise de resíduos e contaminantes em matrizes alimentares. **Scientia Chromatographica**, v. 7, n. 3, p. 157–182, 2015.

LV, G. et al. In-situ quantitative prediction of pesticide residues on plant surface by ATR-FTIR technique coupled with chemometrics. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 305, p. 123432, jan. 2024.

LV, T. et al. Determination of bisphenol A, 4-octylphenol, and 4-nonylphenol in soft drinks and dairy products by ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction combined with derivatization and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Separation Science**, v. 37, n. 19, p. 2757–2763, out. 2014.

MAIA TOALDO, I. et al. Multiclass analysis of antibacterial residues in milk using RP-liquid chromatography with photodiode array and fluorescence detection and tandem mass spectrometer confirmation. **Talanta**, v. 99, p. 616–624, 15 set. 2012.

MALMGREN, B. et al. Changes in proteins, physical stability and structure in directly heated UHT milk during storage at different temperatures. **International Dairy Journal**, v. 71, p. 60–75, 1 ago. 2017.

MANSOUR, S. A. Chemical Pollutants Threatening Food Safety and Security: An Overview. Em: [s.l: s.n.]. p. 73–117.

MANSOUR, S. A. **Chemical pollutants threatening food safety and security: An overview. NATO Science for Peace and Security Series A: Chemistry and Biology** Springer Verlag, , 2011b.

MAPA, M. DA A. P. E A. **Instrução Normativa SDA/MMA 42/1999**. [s.l: s.n.]. Disponível em:

<<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=imprimir...>>.

MARQUES, J. G. DE C. et al. Glyphosate: A Review on the Current Environmental Impacts from a Brazilian Perspective. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology** **2021** **107:3**, v. 107, n. 3, p. 385–397, 17 jun. 2021.

MARTINS, R. O. et al. Miniaturized sample preparation techniques and ambient mass spectrometry as approaches for food residue analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1640, 15 mar. 2021.

MARTINS-JÚNIOR, H. A. et al. **A Rapid Method to Determine Antibiotic Residues in Milk using Liquid Chromatography Coupled to Electrospray Tandem Mass Spectrometry**. **J. Braz. Chem. Soc.** [s.l: s.n.].

MASIÁ, A. et al. **Determination of pesticides and veterinary drug residues in food by liquid chromatography-mass spectrometry: A review.** **Analytica Chimica Acta** Elsevier B.V., , 14 set. 2016.

MBASU, R. J. et al. Advances in quadrupole and time-of-flight mass spectrometry for peptide MRM based translational research analysis. **PROTEOMICS**, v. 16, n. 15–16, p. 2206–2220, 28 ago. 2016.

MCBRIDE, E. M. et al. Paper spray ionization: Applications and perspectives. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p. 722–730, set. 2019.

MEDVEDOVICI, A. et al. Fuzzy clustering evaluation of the discrimination power of UV–Vis and (±) ESI-MS detection system in individual or coupled RPLC for characterization of Ginkgo Biloba standardized extracts. **Talanta**, v. 119, p. 524–532, fev. 2014.

MEENA, R. S. et al. Impact of Agrochemicals on Soil Microbiota and Management: A Review. **Land** **2020**, **Vol. 9**, **Page 34**, v. 9, n. 2, p. 34, 23 jan. 2020.

MENDES, T. P. P. et al. Molecularly imprinted polymer-coated paper as a substrate for highly sensitive analysis using paper spray mass spectrometry: Quantification of metabolites in urine. **Analytical Methods**, v. 9, n. 43, p. 6117–6123, 21 nov. 2017.

MENG, X. et al. Ambient ionization coupled with a miniature mass spectrometer for rapid identification of unauthorized adulterants in food. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 85, p. 103333, jan. 2020.

MERIB, J.; CARASEK, E. Microextração em fase líquida suportada com fibra oca (HF-LPME): Fundamentos e aplicações recentes. **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 4, p. 249–262, 2013a.

MERIB, J.; CARASEK, E. Microextração em fase líquida suportada com fibra oca (HF-LPME): Fundamentos e aplicações recentes. **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 4, p. 249–262, 2013b.

MOHIDEM, N. A. et al. Rice for Food Security: Revisiting Its Production, Diversity, Rice Milling Process and Nutrient Content. **Agriculture**, v. 12, n. 6, p. 741, 24 maio 2022.

MONQUERO, P. A. et al. Mobilidade e persistência de herbicidas aplicados em pré-emergência em diferentes solos. **Planta Daninha**, v. 26, n. 2, p. 411–417, 2008.

MOURA, A. C. M. et al. Rapid monitoring of pesticides in tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) during pre-harvest intervals by paper spray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 310, p. 125938, abr. 2020.

NAGAO, T. et al. Neurobehavioral evaluation of mouse newborns exposed prenatally to low-dose bisphenol A. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 39, n. 2, p. 231–235, 2014.

NESCI, A. et al. Prevention of aflatoxin contamination in stored grains using chemical strategies. **Current Opinion in Food Science**, v. 11, p. 56–60, out. 2016.

OLIVEIRA, A. R. M. DE et al. Microextração em fase líquida (LPME): fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 637–644, 2008.

OMENA, E. et al. A green and simple sample preparation method to determine pesticides in rice using a combination of SPME and rotating disk sorption devices. **Analytica Chimica Acta**, v. 1069, p. 57–65, 3 set. 2019.

PACHECO-SILVA, É.; DE SOUZA, J. R.; CALDAS, E. D. Resíduos de medicamentos veterinários em leite e ovos. **Quim. Nova**, v. 37, n. 1, p. 111–122, 2014.

PAREJA, L. et al. **Analytical methods for pesticide residues in rice. TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, fev. 2011a.

PAREJA, L. et al. Evaluation of various QuEChERS based methods for the analysis of herbicides and other commonly used pesticides in polished rice by LC-MS/MS. **Talanta**, v. 83, n. 5, p. 1613–1622, 15 fev. 2011b.

PERES, F.; MOREIRA, J. C.; ORGS. **É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente**. [s.l.] SciELO Books - Ed. FIOCRUZ, 2003.

PINTO, M. A. L.; QUEIROZ, M. E. C. Extração em ponteiras descartáveis: fundamentos teóricos e aplicações. **Scientia Chromatographica**, v. 7, n. 2, p. 101–108, 2015.

PINZÓN-SÁNCHEZ, C.; RUEGG, P. L. Risk factors associated with short-term post-treatment outcomes of clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 7, p. 3397–3410, jul. 2011.

RAGEH, A. H. et al. Hydrophilic-interaction planar chromatography in ultra-sensitive determination of α -aminocephalosporin antibiotics. Application to analysis of cefalexin in goat milk samples using modified QuEChERS extraction technique. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 166, p. 421–434, 20 mar. 2019.

RAJI, M. A.; SCHUG, K. A. Chemometric study of the influence of instrumental parameters on ESI-MS analyte response using full factorial design. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 279, n. 2–3, p. 100–106, jan. 2009.

RAMOS PAYÁN, M. et al. Application of hollow fiber-based liquid-phase microextraction (HF-LPME) for the determination of acidic pharmaceuticals in wastewaters. **Talanta**, v. 82, n. 2, p. 854–858, 15 jul. 2010.

REBELO, A. M. et al. Simultaneous determination of herbicides in rice by QuEChERS and LC-MS/MS using matrix-matched calibration. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 1, p. 186–193, 1 jan. 2016.

REIS, E. M.; REIS, A. C.; CARMONA, M. A. **Manual de fungicidas: guia para controle químico de doenças de plantas**. 6. ed. Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, 2010.

RIBEIRO, A. R.; LUTZE, H. V.; SCHMIDT, T. C. Base-catalyzed hydrolysis and speciation-dependent photolysis of two cephalosporin antibiotics, ceftiofur and cefapirin. **Water Research**, v. 134, p. 253–260, 1 maio 2018.

RINGNÉR, M. **What is principal component analysis?** Nature Biotechnology LundNPG Nature Publishing Group, , 2008.

RITCHIE, H.; ROSADO, P.; ROSER, M. Agricultural Production. **Our World in Data**, 1 jan. 2023.

ROMAN, E. S. et al. **Como funcionam os herbicidas: da biologia à aplicação**. Passo Fundo: Berthier, 2007.

RUIZ-PEREZ, D. et al. So you think you can PLS-DA? **BMC Bioinformatics**, v. 21, n. S1, p. 2, 9 dez. 2020.

SÁ, I. S. C.; DA SILVA, F. M. A.; NUNOMURA, R. DE C. S. Simplex centroid mixture design, DI-ESI-MS, and chemometric analysis-guided isolation of parinarioidin C from bark of *Brosimum parinarioides* (Moraceae). **Phytochemistry Letters**, v. 50, p. 25–30, ago. 2022.

SAHA, S.; MANDAL, M. K.; HIRAOKA, K. Direct detection of trace level illicit drugs in human body fluids by probe electrospray ionization mass spectrometry (PESI-MS). **Analytical Methods**, v. 5, n. 18, p. 4731–4738, 21 set. 2013.

SAKHI, A. K. et al. Concentrations of phthalates and bisphenol A in Norwegian foods and beverages and estimated dietary exposure in adults. **Environment International**, v. 73, p. 259–269, dez. 2014.

SANTOS, G. R. DOS et al. Efeito da aplicação de fungicidas sobre o controle das principais doenças e produtividade do arroz irrigado e de terras altas. **Agropecuária Técnica**, v. 26, n. 1, p. 36–40, 2005.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**. 8ª ed. [s.l.] Editora Thomson, 2009.

STOCCHERO, M. PLS for designed experiments. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 240, p. 104928, set. 2023.

SU, Y.; MA, X.; OUYANG, Z. Rapid screening of multi-class antimicrobial residues in food of animal origin by paper spray mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 434, p. 233–239, nov. 2018a.

SU, Y.; MA, X.; OUYANG, Z. Rapid screening of multi-class antimicrobial residues in food of animal origin by paper spray mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 434, p. 233–239, nov. 2018b.

TAN, X. W. et al. Determination of Trace Bisphenol A in Water Using Three-phase Hollow Fiber Liquid-phase Microextraction Coupled with High Performance Liquid Chromatography. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 40, n. 9, p. 1409–1414, 1 set. 2012.

TETRA-PAK. **História da Tetra Pak**. Disponível em: <<https://www.tetrapak.com/pt-br/about-tetra-pak/the-company/history>>. Acesso em: 11 set. 2023.

TOLENTINO JÚNIOR, D. S. et al. Revisão sobre cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas aplicada à análise toxicológica de alimentos. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 5, p. e47910515419, 14 maio 2021.

TUCKER, K. L. Osteoporosis Prevention and Nutrition. **Current Osteoporosis Reports**, v. 7, p. 111–117, 2009.

UNITED-NATIONS. **Transforming our world: the 2030 Agenda for Sustainable Development Transforming our world: the 2030 Agenda for Sustainable Development Preamble.** , 2015.

VALASI, L.; KOKOTOU, M. G.; PAPPAS, C. S. GC-MS, FTIR and Raman spectroscopic analysis of fatty acids of Pistacia vera (Greek variety “Aegina”) oils from two consecutive harvest periods and chemometric differentiation of oils quality. **Food Research International**, v. 148, p. 110590, out. 2021.

VARGAS MEDINA, D. A. et al. Current role of modern chromatography and mass spectrometry in the analysis of mycotoxins in food. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 135, p. 116156, fev. 2021.

VIEIRA, B. D. A. H. et al. **Defensivos agrícolas naturais: uso e perspectivas.** Brasília - DF: Embrapa Meio Ambiente, 2016.

VILARINHO, F. et al. **Bisphenol A in food as a result of its migration from food packaging.** **Trends in Food Science and Technology** Elsevier Ltd, , 1 set. 2019.

VILLAR-NAVARRO, M. et al. A novel application of three phase hollow fiber based liquid phase microextraction (HF-LPME) for the HPLC determination of two endocrine disrupting compounds (EDCs), n-octylphenol and n-nonylphenol, in environmental waters. **Science of The Total Environment**, v. 443, p. 1–6, jan. 2013.

VILLEGAS-ÁLVAREZ, M. C. et al. Optimization of hollow-fiber liquid phase microextraction for polychlorinated biphenyls in human breast milk. **Journal of Chromatography A**, v. 1626, p. 461381, 30 ago. 2020.

WALACH, J.; FILZMOSER, P.; HRON, K. Data Normalization and Scaling: Consequences for the Analysis in Omics Sciences. Em: [s.l: s.n.]. p. 165–196.

WAN, Y. et al. Efficient determination of pesticides in rice by QuEChERS and UV spectroscopy in combination with chemometrics. **Cereal Chemistry**, v. 100, n. 5, p. 1106–1113, 20 set. 2023.

WANG, H. et al. Paper spray for direct analysis of complex mixtures using mass spectrometry. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 49, n. 5, p. 877–880, 25 jan. 2010.

WANG, H. et al. Determination of bisphenol analogues in food-contact plastics using diode array detector, charged aerosol detector and evaporative light-scattering detector. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 186, p. 109778, dez. 2019a.

WANG, H. et al. Determination of bisphenol analogues in food-contact plastics using diode array detector, charged aerosol detector and evaporative light-scattering detector. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 186, p. 109778, dez. 2019b.

WANG, L. et al. Simultaneous determination of four trace level endocrine disrupting compounds in environmental samples by solid-phase microextraction coupled with HPLC. **Talanta**, v. 142, p. 97–103, 23 abr. 2015a.

WANG, L. et al. Simultaneous determination of four trace level endocrine disrupting compounds in environmental samples by solid-phase microextraction coupled with HPLC. **Talanta**, v. 142, p. 97–103, set. 2015b.

WANG, R. et al. The occurrence of bisphenol compounds in animal feed plastic packaging and migration into feed. **Chemosphere**, v. 265, p. 129022, fev. 2021a.

WANG, R. et al. The occurrence of bisphenol compounds in animal feed plastic packaging and migration into feed. **Chemosphere**, v. 265, 1 fev. 2021b.

XIAO, R. et al. Discrimination of conventional and organic rice using untargeted LC-MS-based metabolomics. **Journal of Cereal Science**, v. 82, p. 73–81, jul. 2018.

XU, Z. et al. Preparation and evaluation of superparamagnetic surface molecularly imprinted polymer nanoparticles for selective extraction of bisphenol A in packed food. **Analytical Methods**, v. 3, n. 8, p. 1737, 2011a.

XU, Z. et al. Preparation and evaluation of superparamagnetic surface molecularly imprinted polymer nanoparticles for selective extraction of bisphenol A in packed food. **Analytical Methods**, v. 3, n. 8, p. 1737, 2011b.

YANG, L. et al. SERS strategy based on the modified Au nanoparticles for highly sensitive detection of bisphenol A residues in milk. **Talanta**, v. 179, p. 37–42, mar. 2018.

YUN LI, O.; SHI, X.-M. Food safety regulations within countries of increasing global supplier impact. Em: **Ensuring Global Food Safety**. [s.l.] Elsevier, 2022. p. 151–158.

ZACARCHENCO, P. B.; VAN DENDER, A. G. F.; REGO, R. A. **Brasil Dairy Trends 2020: Tendências de Mercado de Produtos Lácteos**. 1ª ed. Campinas: ITAL, 2017.

ZHANG, H. et al. Internal Extractive Electrospray Ionization Mass Spectrometry for Quantitative Determination of Fluoroquinolones Captured by Magnetic Molecularly Imprinted Polymers from Raw Milk. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 1 dez. 2017.

ZHANG, Y. et al. Detection of chlorpyrifos residue in apple and rice samples based on aptamer sensor: Improving quantitative accuracy with partial least squares model. **Microchemical Journal**, v. 194, p. 109352, nov. 2023.

ZHANG, Z.; COOKS, R. G.; OUYANG, Z. Paper spray: a simple and efficient means of analysis of different contaminants in foodstuffs. **The Analyst**, v. 137, n. 11, p. 2556, 2012a.

ZHANG, Z.; COOKS, R. G.; OUYANG, Z. Paper spray: A simple and efficient means of analysis of different contaminants in foodstuffs. **Analyst**, v. 137, n. 11, p. 2556–2558, 7 jun. 2012b.

ZHANG, Z.-P.; LIU, X.-N.; YA-JUN, Z. National Natural Science Foundation of China (No. 21205093), the Natural Science Basic Research Plan in Shaanxi Province of China (No. 2012JQ2014), and the Science and Technology Plan in Xi'an City of China. **CHINESE JOURNAL OF ANALYTICAL CHEMISTRY**, v. 42, n. 1, p. 145–152, 2014.

ZHAO, H. et al. Investigation on fragmentation pathways of bisphenols by using electrospray ionization Orbitrap mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 30, n. 16, p. 1901–1913, 30 ago. 2016.