



FURG

Tese de Doutorado

**DETERMINAÇÃO DE CONSERVANTES EM ALIMENTOS
PROCESSADOS EMPREGANDO QuEChERS, SILLME E
HPLC-UV: ESTUDO DE MÉTODOS E ESTIMATIVA DA
INGESTÃO DIÁRIA**

Jean Lucas de Oliveira Arias

PPGQTA

Rio Grande, RS - Brasil

2019

**DETERMINAÇÃO DE CONSERVANTES EM ALIMENTOS
PROCESSADOS EMPREGANDO QuEChERS, SILLME E
HPLC-UV: ESTUDO DE MÉTODOS E ESTIMATIVA DA
INGESTÃO DIÁRIA**

por

JEAN LUCAS DE OLIVEIRA ARIAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Química Tecnológica e Ambiental da Universidade
Federal do Rio Grande (RS), como requisito parcial
para obtenção do título de DOUTOR EM QUÍMICA.

PPGQTA

Rio Grande, RS - Brasil

2019

Universidade Federal do Rio Grande - FURG
Escola de Química e Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Defesa de Tese

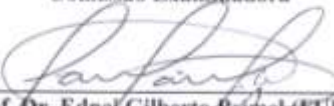
**DETERMINAÇÃO DE CONSERVANTES EM ALIMENTOS PROCESSADOS
EMPREGANDO QUÊCHERS, SILLME E HPLC-UV: ESTUDO DE MÉTODOS E
ESTIMATIVA DA INGESTÃO DIÁRIA**

Elaborado por

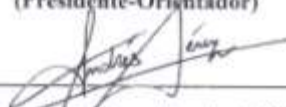
Jean Lucas de Oliveira Arias

Como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Química

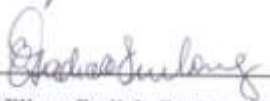
Comissão Examinadora



Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel (FURG)
(Presidente-Orientador)



Prof. Dr. Andrés Perez Parada (UDELAR)



Prof. Dr. Eliana Badiale Furlong (FURG)



Prof. Dr. Osmar Damian Prestes (UFSM)



Dr. Sergiane Caldas Barbosa (FURG)

Rio Grande, 4 de outubro de 2019.

*Não to mandei eu? Esforça-te, e tem bom ânimo; não temas, nem te espantes;
porque o Senhor teu Deus é contigo, por onde quer que andares.*

Josué 1:9

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel**, pela oportunidade que me foi dada de trabalhar no grupo durante todos estes anos, desde a iniciação científica, sendo grande incentivador ao longo da minha trajetória acadêmica. Também por sua amizade, que espero levar por muitos anos. Obrigado por tudo.

Aos professores **Dr. Osmar Damian Prestes, Dr. Andrés Pérez Parada e Dra. Eliana Badiale Furlong** pela disposição em participar na defesa de tese e por suas valiosas contribuições na finalização deste estudo.

A **Dra. Sergiane Caldas Barbosa**, pela disposição em me ajudar em todas as etapas da minha formação. Sua colaboração foi fundamental ao longo desses anos. Sou muito grato por todos os ensinamentos que você me transferiu e me espelho em você como profissional. Obrigado por sua amizade.

A **Dra. Larine Kupski**, por sua alegria contagiante, sempre disposta a me ajudar. Suas colaborações foram preciosas para este trabalho. Espero que possamos trabalhar juntos, independentemente da distância. Muito obrigado.

Aos meus pais, **Tomas e Carla**, a quem eu dedico este trabalho. Hoje eu consigo entender um pouco do que vocês tentaram me ensinar. Obrigado por todos os valores e pelo amor incondicional. Eu amo vocês.

Aos meus irmãos, **Carol e Cauã**, por todo o apoio desde sempre. Vocês continuam fazendo muita falta perto de mim. Eu amo vocês.

A minha amada esposa **Antunielle**, por ser a minha base forte. Se eu não desisti foi por você estar ao meu lado. Essa conquista é nossa. Obrigado por ser quem você é, minha maior incentivadora e companheira. Eu te amo.

As minhas cadelinhas **Atena**, que jamais esquecerei, e **Fiona**, por alegrarem meu dia, sempre dispostas a dar amor. Vocês me ensinaram a ser mais humano.

A minha família gaúcha, meus queridos sogros, **Mário e Eva**, meus cunhados, **Thiago e Daiane**, e meus sobrinhos, **Felipe, Isadora e Cecília**, por tornarem o Rio Grande do Sul um lar para mim. Obrigado por todo o apoio.

A todos os meus bons amigos que me acompanharam nesta caminhada, proporcionando momentos de descontração fundamentais para manter a mente sã. Agradeço em especial aos meus queridos amigos **Matheus e Janaína**, pelos

inúmeros momentos que tivemos ao longo desses últimos anos. Espero levar vocês para toda a vida.

A todos os colegas de **LACOM** ao longo desses anos que tive o prazer de conviver, que jamais negaram ajuda com os experimentos que realizei e proporcionaram momentos de descontração sem igual. Obrigado pelo carinho e amizade de sempre.

A grande amiga de laboratório **Caroline Rocha**, que tornava cada experimento mais interessante. Sua motivação em me ajudar e empolgação para aprender foram fundamentais para que eu não perdesse a vontade em concluir este trabalho. Desejo-te um futuro brilhante.

Aos meus colegas do **CIA, Diego e Roseane**. Obrigado por segurarem a barra durante a execução dos experimentos. Como já lhes disse, se tudo der errado, trabalharemos juntos por muitos anos. E será um prazer enorme para mim. Também agradeço as colegas que por aqui passaram, **Caroline e Ana**.

A **Rosane**, secretária do PPGQTA, por todos os esclarecimentos e atenção disponibilizados.

A **FURG**, pela oportunidade ao longo destes anos de me profissionalizar com qualidade e se tornar a minha segunda casa.

Aos **professores do PPGQTA**, que acompanharam a minha trajetória e contribuíram com a minha formação.

A **Deus**, por toda a proteção nos momentos mais difíceis e por mais esta vitória concedida. Toda honra e toda glória seja dada a **Ele**.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xiii
RESUMO	xv
ABSTRACT.....	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
3.1. Aditivos alimentares	6
3.2. Conservantes	8
3.2.1. Ácido benzoico e seus sais - benzoatos	11
3.2.2. Ácido sórbico e seus sais - sorbatos	13
3.2.3. Parabenos	14
3.3. Ingestão Diária Aceitável.....	16
3.4. Avaliação da Ingestão Diária de Conservantes.....	16
3.5. Métodos analíticos para a determinação de conservantes em alimentos	17
3.5.1. Métodos oficiais para a determinação de conservantes em alimentos	18
3.5.2. Métodos inovadores para determinação de conservantes em alimentos e a química analítica verde	21
3.5.2.1. Método QuEChERS	29
3.5.2.2. Técnica SILLME de preparo de amostra	35
4. MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1. Conservantes selecionados para estudo	42
4.2. Instrumentação utilizada.....	44
4.3. Reagentes, solventes e materiais	44
4.4. Processamento das amostras	46
4.5. Preparo das soluções analíticas.....	46
4.6. Padronização do sistema cromatográfico para determinação de conservantes em alimentos	46
4.7. Seleção das amostras para padronização e validação dos métodos ..	48
4.8. Desenvolvimento de método para determinação de conservantes em alimentos processados empregando QuEChERS e HPLC-UV	48
4.8.1. Método QuEChERS proposto por Arias <i>et al.</i> (2018).....	49

4.8.2.	Modificação do método QuEChERS proposto por Arias <i>et al.</i> (2018)..	49
4.8.3.	Influência do NaCl na recuperação dos conservantes	49
4.8.4.	Avaliação do método QuEChERS frente a diferentes alimentos processados	50
4.8.5.	Avaliação da massa de amostra	50
4.8.6.	Aplicabilidade do método proposto	51
4.8.7.	Estimativa da ingestão diária de conservantes	52
4.9.	Desenvolvimento de método para determinação de conservantes em alimentos processados empregando SILLME e HPLC-UV	53
4.9.1.	Modificação do método proposto por Du <i>et al.</i> (2014)	53
4.9.2.	Influência da massa de MgSO ₄ na recuperação dos conservantes	54
4.9.3.	Influência do pH na recuperação dos conservantes	54
4.9.4.	Influência da adição de NaCl na recuperação dos conservantes	54
4.9.5.	Avaliação do método SILLME frente a diferentes alimentos processados	54
4.10.	Validação dos métodos.....	55
4.10.1.	Limites de detecção e quantificação	55
4.10.2.	Curva analítica e linearidade	56
4.10.3.	Exatidão	57
4.10.4.	Precisão	57
4.10.5.	Incerteza das medições	58
4.10.6.	Efeito matriz	59
4.10.7.	Seletividade	60
4.11.	Comparação entre os métodos QuEChERS e SILLME	60
4.12.	Controle de qualidade nas determinações.....	61
4.13.	Limpeza das vidrarias	61
4.14.	Tratamento estatístico dos dados	61
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	62
5.1.	Desenvolvimento de método para determinação de conservantes em alimentos processados empregando QuEChERS e HPLC-UV	62
5.1.1.	Padronização do sistema de determinação por HPLC-UV	62
5.1.2.	Padronização do método QuEChERS de preparo de amostras	66
5.1.2.1.	Avaliação do método Arias <i>et al.</i> 2018.....	66
5.1.2.2.	Influência da adição de NaCl na recuperação dos conservantes	66
5.1.2.3.	Influência da massa de amostra na concentração dos conservantes ..	69

5.1.2.4.	Método QuEChERS padronizado.....	71
5.1.2.5.	Avaliação do método QuEChERS frente a diferentes amostras	73
5.1.3.	Validação do método empregando QuEChERS e HPLC-UV para determinação de conservantes em alimentos.....	76
5.1.3.1.	Limites de detecção e quantificação	76
5.1.3.2.	Curva analítica, linearidade e faixa de trabalho.....	78
5.1.3.3.	Exatidão, precisão e incerteza das medições	79
5.1.3.4.	Efeito matriz	82
5.1.3.5.	Seletividade do método QuEChERS.....	82
5.1.4.	Aplicabilidade	84
5.1.5.	Estimativa da ingestão diária de conservantes	94
5.2.	Desenvolvimento de método para determinação de conservantes em alimentos processados empregando SILLME e HPLC-UV.....	96
5.2.1.	Padronização da técnica SILLME de preparo de amostras	96
5.2.1.1.	Influência da massa de $MgSO_4$ nas recuperações dos conservantes. 96	
5.2.1.2.	Influência do pH na recuperação dos conservantes.....	98
5.2.1.3.	Influência da adição de NaCl na recuperação dos conservantes.....	101
5.2.1.4.	Método SILLME padronizado	103
5.2.1.5.	Avaliação do método SILLME frente a diferentes amostras.....	105
5.2.2.	Validação do método empregando SILLME e HPLC-UV para determinação de conservantes em alimentos.....	107
5.2.2.1.	Limites de detecção e quantificação	107
5.2.2.2.	Curva analítica, linearidade e faixa de trabalho.....	109
5.2.2.3.	Exatidão, precisão e incerteza das medições	109
5.2.2.4.	Seletividade da técnica SILLME.....	110
5.3.	Comparação entre os métodos desenvolvidos.....	111
5.4.	Comparação dos métodos desenvolvidos com os métodos oficiais para determinação de conservantes em alimentos.....	114
5.5.	Comparação dos métodos desenvolvidos com métodos disponíveis na literatura para determinação de conservantes em alimentos.....	118
6.	CONCLUSÕES	121
7.	TRATAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS	123
8.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	124
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125
10.	PRODUÇÃO CIENTÍFICA NO PERÍODO DE DOUTORADO.....	138
	APÊNDICE A.....	142

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classificação dos aditivos alimentares de acordo com a função que desempenham nos alimentos.....	8
Figura 2. Estrutura química do ácido benzoico	11
Figura 3. Estrutura química do ácido sórbico	13
Figura 4. Estrutura química dos parabenos	15
Figura 5. Publicações envolvendo o método QuEChERS desde 2003	30
Figura 6. Principais etapas dos métodos QuEChERS original, acetato e citrato.	32
Figura 7. Principais etapas da SILLME empregada por Du et al., 2014	37
Figura 8. Gráfico de espécies em função do pH para os conservantes benzoato, sorbato e metilparabeno.....	64
Figura 9. Cromatograma obtido por HPLC-UV nas condições padronizadas a partir de uma solução padrão 10 mg L^{-1} dos conservantes em estudo	65
Figura 10. Influência da massa de NaCl nas recuperações dos conservantes. Experimentos foram realizados utilizando 1 g de leite UHT fortificado a 10 mg kg^{-1} , 10 mL de MeCN e 4 g de MgSO_4 . As barras de erro indicam RSD (%). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).....	67
Figura 11. Avaliação do efeito matriz na determinação de conservantes frente a diferentes massas de NaCl no método QuEChERS	69
Figura 12. Esquema do método QuEChERS padronizado para determinação de conservantes em alimentos.....	72
Figura 13. Avaliação do efeito matriz na determinação de conservantes frente a diferentes amostras no método QuEChERS	75
Figura 14. Gráfico de linearidade para o conservante benzoato na curva analítica preparada na fase móvel.....	79
Figura 15. Cromatogramas para uma amostra de refrigerante (a) branco e (b) fortificada na concentração de 10 mg kg^{-1} , submetida ao QuEChERS padronizado	83
Figura 16. Cromatogramas para uma amostra de ketchup (a) branco e (b) fortificada na concentração de 10 mg kg^{-1} , submetida ao QuEChERS padronizado	83
Figura 17. Cromatogramas para uma amostra de picles (a) branco e (b) fortificada na concentração de 10 mg kg^{-1} , submetida ao QuEChERS padronizado	84
Figura 18. Cromatograma para uma amostra de refrigerante, positiva para os conservantes benzoato (260 mg kg^{-1}) e sorbato (46 mg kg^{-1}).	85
Figura 19. Cromatograma para uma amostra de azeitona, positiva para o conservante benzoato (858 mg kg^{-1}).	86

Figura 20. Cromatograma para uma amostra de requeijão, positiva para o conservante sorbato (681 mg kg^{-1}).	89
Figura 21. Cromatograma para uma amostra de adoçante de mesa líquido, positiva para os conservantes benzoato (429 mg kg^{-1}) e metilparabeno (452 mg kg^{-1}).	91
Figura 22. Influência da massa de MgSO_4 nas recuperações dos conservantes empregando a SILLME. Experimentos foram realizados utilizando $0,5 \text{ g}$ de leite UHT fortificado a 10 mg kg^{-1} , $4,5 \text{ mL}$ de água ultrapura e 1 mL de MeCN. As barras de erro indicam RSD (%).	97
Figura 23. Influência do pH nas recuperações dos conservantes empregando a técnica SILLME. Experimentos foram realizados utilizando $0,5 \text{ g}$ de leite UHT fortificado a 10 mg kg^{-1} , $4,5 \text{ mL}$ de água ultrapura nos diferentes valores de pH, 2 g de MgSO_4 e 1 mL de MeCN. As barras de erro indicam RSD (%). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).	99
Figura 24. Influência da adição de NaCl nas recuperações dos conservantes empregando a SILLME. Experimentos foram realizados utilizando $0,5 \text{ g}$ de leite UHT fortificado a 10 mg kg^{-1} , $4,5 \text{ mL}$ de solução tampão acetato pH 4,2, 2 g de MgSO_4 e 1 mL de MeCN. As barras de erro indicam RSD (%).	102
Figura 25. Esquema do método SILLME padronizado para determinação de conservantes em alimentos	104
Figura 26. Avaliação do efeito matriz na determinação de conservantes frente a diferentes amostras no método SILLME	107
Figura 27. Cromatogramas para uma amostra de refrigerante (a) branco e (b) fortificada na concentração de 10 mg kg^{-1} , submetida a SILLME padronizada	110
Figura 28. Cromatogramas para uma amostra de ketchup (a) branco e (b) fortificada na concentração de 10 mg kg^{-1} , submetida a SILLME padronizada	111
Figura 29. Cromatogramas para uma amostra de picles (a) branco e (b) fortificada na concentração de 10 mg kg^{-1} , submetida a SILLME padronizada	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Conservantes permitidos no Brasil e suas principais aplicações	10
Tabela 2. Revisão de trabalhos que realizaram o desenvolvimento de métodos para a determinação de conservantes em alimentos	22
Tabela 3. Exemplos de trabalhos que empregaram o método QuEChERS para determinação de diferentes compostos em amostras de alimentos	33
Tabela 4. Exemplos de trabalhos que empregaram técnicas derivadas da SALLE para determinação de compostos orgânicos em diferentes matrizes.....	38
Tabela 5. Propriedades físico-químicas e valores de ingestão diária aceitável (IDA) para os conservantes em estudo.	43
Tabela 6. Composições de fase móvel testadas na otimização da separação dos conservantes por HPLC-UV e as influências no tempo de retenção	63
Tabela 7. Condições cromatográficas padronizadas para o sistema HPLC-UV na determinação de conservantes	65
Tabela 8. Comparação das concentrações \pm desvio padrão (mg kg^{-1}) de conservantes observadas quando diferentes massas de amostra são utilizadas.	70
Tabela 9. Recuperações (R%) e desvio padrão relativo (RSD) para os conservantes em diferentes alimentos processados empregando o método QuEChERS de preparo de amostras. Experimentos foram realizados em triplicata na concentração de 10 mg kg^{-1} para cada conservante em cada amostra.	74
Tabela 10. Limite de detecção instrumental (LD_i), limite de quantificação instrumental (LQ_i), limite de detecção do método (LD_m), limite de quantificação do método (LQ_m), faixa linear, coeficiente angular (a), intercepto (b), coeficiente de determinação (R^2) para as curvas analíticas preparadas no solvente e no extrato e efeito matriz. Foi utilizado como matriz o leite UHT integral.	77
Tabela 11. Avaliação da exatidão, em termos de recuperação (R%), precisão, em termos de repetibilidade (RSD_r) e precisão intermediária (RSD_{pi}) e incerteza da medição (U %) do método QuEChERS. Experimentos foram realizados utilizando como amostra representativa o leite UHT integral, isenta de conservantes.....	81
Tabela 12. Concentração de benzoato em diferentes alimentos e estimativa da ingestão diária baseada nos dados de consumo diário médio do IBGE (2011).	87
Tabela 13. Concentração de sorbato em diferentes alimentos e estimativa da ingestão diária baseada nos dados de consumo diário médio do IBGE (2011).	90
Tabela 14. Concentração de metilparabeno em diferentes alimentos e estimativa da ingestão diária baseada nos dados de consumo diário médio do IBGE (2011).	93
Tabela 15. Recuperações (R%) e desvio padrão relativo (RSD) para os conservantes em diferentes alimentos processados empregando o método SILLME	

de preparo de amostras. Experimentos foram realizados em triplicata na concentração de 10 mg kg^{-1} para cada conservante em cada amostra.....	106
Tabela 16. Limite quantificação do método (LQ_m), faixa linear, exatidão, em termos de recuperação ($R\%$), precisão do método, em termos de repetibilidade (RSD_r) e precisão intermediária (RSD_{pi}) e incerteza da medição ($U\%$). Experimentos foram realizados em triplicata utilizando como amostra representativa o leite UHT integral, isenta de conservantes.....	108
Tabela 17. Comparação das concentrações \pm desvio padrão (mg kg^{-1}) de conservantes em diferentes amostras obtidas através dos métodos QuEChERS e SILLME. Cada amostra foi analisada em triplicata por cada método.	113
Tabela 18. Comparação de custos e volume de resíduos gerados entre o QuEChERS e a SILLME.....	114
Tabela 19. Comparação entre os métodos de referência para determinação de conservantes em alimentos com os métodos propostos neste trabalho.....	117
Tabela 20. Comparação entre os métodos propostos neste trabalho com outros métodos empregados para determinação de conservantes em alimentos.....	120

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC – Associação de Comunidades Analíticas, do inglês, *The Association of Analytical Communities*

CCFAC - Comitê do Codex sobre Aditivos Alimentares, do inglês, *Codex Committee on Food Additives and Contaminants*

CEN – Comité Europeu de Normalização, do francês, *Comité Européen de Normalisation*

DLLME – Microextração Líquido-líquido Dispersiva, do inglês *Dispersive Liquid-liquid Microextraction*

DSPE – Extração em Fase Sólida Dispersiva, do inglês, *Dispersive Solid Phase Extraction*

EDI – Estimativa da Ingestão Diária, do inglês *Estimate of Daily Intake*

FAO – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, do inglês *Food and Agriculture Organization*

FDA – Agência Norte Americana de Administração de Drogas e Alimentos, do inglês, *Food and Drug Administration*

GC – Cromatografia Gasosa, do inglês, *Gas Chromatography*

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IDA – Ingestão Diária Aceitável

IDM – Ingestão Diária Média

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

INS – Sistema Internacional de Numeração de Aditivos Alimentares, do inglês *International Numbering System*

ISO – Organização Internacional para Padronização, do inglês *International Organization for Standardization*

JECFA - Comitê Conjunto de Especialistas da FAO/WHO sobre Aditivos Alimentares, do inglês *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*

LLE – Extração Líquido-líquido, do inglês, *Liquid-liquid Extraction*

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

LQ_i – LQ instrumental

LQ_m – LQ do método

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MeCN- Acetonitrila

NMKL – Comitê Nórdico de Análise de Alimentos, do inglês *Nordic Committee on Food Analysis*

pKa – Potencial de dissociação ácida

POF – Pesquisa de Orçamentos Familiares

QuEChERS – Método rápido, fácil, barato, efetivo, robusto e seguro, do inglês, *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*

r – Coeficiente de correlação linear

R% - Recuperação

RSD – Desvio Padrão Relativo, do inglês, *Relative Standard Deviation*

RSD_{pi} – Desvio Padrão Relativo para Precisão Intermediária

RSD_r – Desvio Padrão Relativo para Repetitividade

s – Estimativa do desvio padrão absoluto

SALLE – Extração Líquido-líquido Assistida por Sal, do inglês, *Salting-out Assisted Liquid-liquid Extraction*

SILLME – Microextração Líquido-líquido induzida pelo efeito *salting-out*, do inglês, *Salting-out Induced Liquid-liquid Microextraction*

s/n – Relação sinal-ruído

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

UHT – Tratamento à Ultra Alta Temperatura, do inglês, *Ultra High Temperature*

WHO – Organização Mundial da Saúde, do inglês, *World Health Organization*

RESUMO

Título: DETERMINAÇÃO DE CONSERVANTES EM ALIMENTOS PROCESSADOS EMPREGANDO QuEChERS, SILLME E HPLC-UV: ESTUDO DE MÉTODOS E ESTIMATIVA DA INGESTÃO DIÁRIA

Autor: Jean Lucas de Oliveira Arias

Orientador: Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel

Entre os diferentes conservantes permitidos para uso nos alimentos, podemos destacar os benzoatos, sorbatos e parabenos. Esses conservantes atuam como agentes antimicrobianos, protegendo os alimentos contra contaminação por fungos, leveduras e bactérias. Uma vez que essas substâncias são estranhas ao nosso organismo, sendo potencialmente tóxicas, é necessário o controle da exposição do consumidor, bem como estabelecer limites seguros para o seu uso. Esta avaliação é respaldada pelo controle da Ingestão Diária Aceitável (IDA), que representa a quantidade de substâncias que podem ser consumidas diariamente sem riscos para a saúde, mesmo em longo prazo. Para tal, é necessária a avaliação contínua destes níveis em diferentes alimentos. Neste trabalho foram padronizados dois métodos, empregando QuEChERS e Microextração Líquido-Líquido Induzida pelo Efeito *Salting-out* e determinação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Detector por Ultravioleta de conservantes em alimentos processados de diferentes categorias, como derivados lácteos, bebidas não alcoólicas, molhos e condimentos, doces e geleias, conservas, *fast food* e adoçantes artificiais. Nas condições padronizadas para os métodos QuEChERS e SILLME, as recuperações variaram entre 77 e 109%, com desvio padrão relativo $\leq 20\%$ e incerteza das medições $\leq 39\%$. Os limites de quantificação do método variaram entre 0,13 e 0,33 mg kg⁻¹ e 0,03 e 0,07 mg kg⁻¹, respectivamente. Concentrações de até 2040 mg kg⁻¹ para benzoato, 3185 mg kg⁻¹ para sorbato e 452 mg kg⁻¹ para metilparabeno foram observadas nas 82 diferentes amostras avaliadas pelo método QuEChERS. Com esses dados, foi possível estimar a ingestão diária de conservantes, onde foi observado para o benzoato valores de até 25% da IDA, em comparação com o sorbato (< 5% da IDA) e parabenos (< 1% da IDA) quando o consumo médio é considerado. Os métodos foram comparados, obtendo concordância entre os dados entre 94 a 99%. Desta forma, dois métodos eficientes foram desenvolvidos e validados e podem ser empregados em rotina na determinação de conservantes em diferentes tipos de alimentos com as vantagens de serem mais simples, rápidos e baratos que os métodos oficiais.

Palavras-chaves: conservantes, alimentos processados, QuEChERS, SILLME, HPLC-UV, ingestão diária.

ABSTRACT

Title: DETERMINATION OF PRESERVATIVES IN PROCESSED FOODS EMPLOYING QuEChERS, SILLME AND HPLC-UV: STUDY OF METHODS AND ESTIMATE OF DAILY INTAKE

Author: Jean Lucas de Oliveira Arias

Advisor: Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel

Among the different preservatives allowed for use in foods, benzoates, sorbates and parabens can be highlighted. These preservatives act as antimicrobial agents, protecting food against contamination by molds, yeasts and bacteria. Once these substances are strange to our body, being potentially toxic, it is necessary to control the exposition, as well as establishing safe limits for their usage. The evaluation of safety in use of preservatives is based on the control of the Acceptable Daily Intake (ADI), which means the amount of substances that can be ingested daily without risks to health, even in long exposure. For such purpose, it is necessary the continuous evaluation of these levels in different foods. In this work, two extraction methods employing QuEChERS and Salting-out Induced Liquid-Liquid Microextraction and preservatives determination by High Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detector in foods from different categories, such as dairy products, non-alcoholic beverages, spices and sauces, fruit jams and pastes, preserves, fast foods and artificial sweeteners were optimized. In the best conditions for both the QuEChERS and SILLME methods, recoveries between 77 and 109%, with relative standard deviation $\leq 20\%$ and measurement uncertainty $\leq 39\%$ were achieved. The method limits of quantification were between 0.13 and 0.33 mg kg⁻¹ and 0.03 and 0.07 mg kg⁻¹, respectively. Concentrations up to 2040 mg kg⁻¹ for benzoates, 3185 mg kg⁻¹ for sorbates and 452 mg kg⁻¹ for methylparaben were observed under the 82 different food samples evaluated by the QuEChERS method. Additionally, daily intakes of preservatives were estimated. Regarding benzoates, relatively high intakes were estimated (25% of the acceptable daily intake – ADI) in comparison with sorbates (5% of ADI) and parabens (<1% of ADI), when mean consumption is considered. The SILLME method was applied successfully in the determination of preservatives in foods and it was compared to the QuEChERS method, where data agreement between 94 to 99% was achieved. Finally, two efficient and simple methods were developed that can be used in replacement of the traditional ones in routinely determination of preservatives in different kind of foods, with the advantages of being simplest, faster and cheaper than the official methods.

Keywords: preservatives, processed food, QuEChERS, SILLME, HPLC-UV, daily intake.

1. INTRODUÇÃO

A conservação de alimentos sempre foi de grande importância na vida do homem. Compostos como sal, açúcar, ácidos e fumaça de madeira têm sido usados como conservadores de alimentos há séculos. Diferentes aditivos são adicionados para manter ou melhorar o frescor, sabor, textura ou aparência dos alimentos, entre eles, os conservantes. Estes têm como função prevenir ou inibir o crescimento microbiano e evitar alterações químicas indesejáveis, mantendo a qualidade dos produtos e aumentando seu tempo de vida útil (CAROCHO *et al.*, 2015).

No Brasil, a legislação vigente permite o uso de diferentes conservantes em alimentos processados, dentre os quais, podemos destacar os benzoatos, sorbatos e os parabenos. Uma vez que as substâncias utilizadas como conservantes são estranhas ao nosso organismo, sendo potencialmente tóxicas, seu uso em alimentos é permitido após a confirmação da necessidade de uso e estabelecimento de níveis seguros. Esta envolve a avaliação toxicológica do aditivo e avaliação da exposição do consumidor à substância, quando somadas todas as possíveis fontes.

A Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, do Inglês *Food and Agriculture Organization*) e a Organização Mundial da Saúde (WHO, do Inglês *World Health Organization*) possuem um programa para aditivos em alimentos cujo objetivo é avaliá-los de forma sistemática, fornecendo subsídios aos governos para que controlem o seu uso, levando em consideração a saúde humana. Os dois grupos responsáveis pela implementação do programa são o Comitê Conjunto de Especialistas da FAO/WHO sobre Aditivos Alimentares (JECFA, do Inglês *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*) e o Comitê do Codex sobre Aditivos Alimentares (CCFAC, do Inglês *Codex Committee on Food Additives and Contaminants*). O JECFA realiza a avaliação toxicológica dos aditivos alimentares e estabelece valores de Ingestão Diária Aceitável (IDA) para as substâncias avaliadas, expressa em $\text{mg kg}^{-1} \text{ peso corporal}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, sendo a quantidade de um aditivo que pode ser ingerida pelo homem diariamente sem risco apreciável à saúde. Na prática, os valores de IDA são utilizados para estabelecer

quantidades aceitáveis de aditivos a serem utilizados nos alimentos, de forma que seu consumo não a exceda.

Com o intuito de garantir a segurança dos alimentos e a conformidade com as legislações, reprimindo fraude nos alimentos, métodos de detecção rápidos e confiáveis são necessários. Neste sentido, o *Codex Alimentarius* recomenda diferentes métodos gerais para determinação de conservantes em alimentos. Para sucos de frutas, néctares, frutas e vegetais processados, leite e derivados, diferentes métodos do Comitê Nórdico de Análise de Alimentos (NMKL, do Inglês *Nordic Committee on Food Analysis*), Organização Internacional para Padronização (ISO, do Inglês *International Organization for Standardization*) e da Associação de Comunidades Analíticas (AOAC, do Inglês *The Association of Analytical Communities*) são empregados oficialmente. Entretanto, todos eles apresentam diferentes desvantagens, como baixa seletividade, escopo limitado para um conjunto de amostras e faixa de concentração, realização de diferentes etapas e uso de solventes tóxicos, sendo prejudicial ao analista e ao meio ambiente.

Dessa forma, justifica-se o desenvolvimento de métodos analíticos eficientes, capazes de realizar a extração simultânea de conservantes em ampla faixa de concentração e em diferentes alimentos processados, fornecendo resultados confiáveis.

O desenvolvimento de métodos capazes de realizar a extração simultânea de diferentes conservantes é um desafio analítico, principalmente quando se tratam de amostras complexas, como os alimentos processados, os quais possuem diferentes propriedades e constituintes, que variam de amostra para amostra. Outro desafio é a busca por métodos com os princípios da Química Verde, minimizando tanto os custos como os impactos causados ao ambiente e ao analista e, que ao mesmo tempo, atinjam os níveis estabelecidos, de forma a demonstrar sua aplicabilidade frente às legislações vigentes.

A etapa de preparo de amostra é responsável por promover a extração e o enriquecimento dos analitos e a remoção, tanto quanto possível, dos interferentes, além de tornar a amostra compatível com a técnica de determinação a ser utilizada (PRESTES *et al.*, 2009). Diferentes técnicas de preparo de amostra podem ser empregadas para a determinação de conservantes em alimentos, com destaque ao QuEChERS e a SILLME.

Desenvolvido em 2003, o método QuEChERS surgiu com o objetivo de superar as limitações práticas dos métodos multirresíduos de extração disponíveis na época (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). Originalmente projetado para determinação de resíduos de agrotóxicos em frutas e vegetais, o método QuEChERS tem sido empregado com sucesso para a determinação de diferentes classes de analitos. Este método apresenta as vantagens de ser rápido, fácil, barato, econômico, robusto e seguro, sendo um procedimento dinâmico, capaz de ser realizado em qualquer laboratório (PRESTES *et al.*, 2009).

Em nosso grupo, o método QuEChERS já demonstrou a sua aplicabilidade na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em amostras de leite de diferentes tipos (ARIAS *et al.*, 2018). Pretende-se, a partir deste método, expandir o seu escopo de aplicação para a determinação de conservantes em diferentes tipos de alimentos processados.

Outra técnica de preparo de amostras com potencial para a determinação de conservantes em alimentos processados é a Microextração Líquido-líquido Induzida pelo Efeito *Salting-out* (SILLME, do inglês *Salting-out Induced Liquid-liquid Microextraction*). Esta técnica, baseada nas técnicas de Extração Líquido-Líquido Assistida por Vórtex (VALLME, do Inglês *Vortex Assisted Liquid-liquid Microextraction*) e Extração Líquido-líquido Assistida por *Salting-out* (SALLE, do Inglês *Salting-out Assisted Liquid-liquid Extraction*), foi inicialmente proposta para determinação de fluoroquinolonas em amostras de água, alimentos e matrizes biológicas (DU *et al.*, 2014). Esta técnica emprega extração com acetonitrila e partição com MgSO₄, semelhante ao método QuEChERS, porém, com quantidades de amostra e reagentes reduzidas, caracterizando-se como uma técnica miniaturizada.

É de grande relevância o desenvolvimento de métodos capazes de determinar conservantes em alimentos processados, visto que a saúde humana pode ser colocada em risco pelo consumo de alimentos com níveis impróprios. Além disso, dados a respeito da concentração de conservantes em alimentos são escassos no Brasil, tal qual estudos a respeito da ingestão diária desses aditivos. Assim, este estudo visa o desenvolvimento de métodos empregando QuEChERS, SILLME e Cromatografia Líquida acoplada ao Detector por Ultravioleta (HPLC-UV)

para determinação de conservantes em alimentos processados pertencentes as categorias dos derivados lácteos, bebidas não alcoólicas, molhos e condimentos, doces e geleias, conservas, *fast food* e adoçantes artificiais, visando a obtenção de métodos simples, rápidos, menos agressivos ao meio ambiente, que possibilitem a sua aplicação em diferentes tipos de amostras para fácil uso na rotina de um laboratório, colaborando com o desenvolvimento da Química Analítica e fornecendo alternativas aos métodos oficiais, amplamente empregados e com inúmeras desvantagens. Após a padronização dos métodos, será possível estimar a ingestão diária dos conservantes a partir de alimentos processados, comparando os dados obtidos com a IDA para cada conservante. Desta forma, este trabalho também contribuirá com a geração de dados a respeito da presença dessas substâncias nos alimentos, fornecendo subsídios para que possamos avaliar a qualidade dos produtos que têm chegado as nossas mesas e o respeito à legislação.

2.OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral desenvolver e validar dois métodos de extração empregando QuEChERS e SILLME para a determinação de conservantes por HPLC-UV em diferentes alimentos processados e estimar a sua ingestão diária.

Para desenvolver e validar os métodos foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- ✓ Definir os parâmetros instrumentais para análise de conservantes por HPLC-UV;
- ✓ Definir os parâmetros de extração para os métodos QuEChERS e SILLME, de maneira a obter procedimentos simples e de baixo custo;
- ✓ Avaliar os métodos propostos em diferentes alimentos processados, demonstrando a robustez dos mesmos;
- ✓ Validar os métodos, avaliando: curva analítica, linearidade, limites de detecção e quantificação, exatidão, precisão, efeito matriz e incerteza das medições;
- ✓ Comparar os métodos desenvolvidos, pela avaliação de amostras que contêm os conservantes em sua composição;
- ✓ Avaliar a concentração de conservantes em alimentos processados pertencentes às categorias dos derivados lácteos, bebidas não alcoólicas, molhos e condimentos, doces e geleias, conservas, *fast food* e adoçantes artificiais, comercializados no município de Rio Grande, RS;
- ✓ Estimar a ingestão diária de conservantes a partir de dados de consumo médio de alimentos processados e os dados obtidos nas determinações analíticas realizadas, comparando com os dados de IDA;
- ✓ Traçar um comparativo dos métodos propostos com os métodos disponíveis para a determinação de conservantes em alimentos, assim como comparar com os métodos oficiais.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Aditivos alimentares

A Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde define como aditivo alimentar qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem propósito de nutrir, com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento. Esta definição não inclui os contaminantes ou substâncias nutritivas que sejam incorporadas ao alimento para manter ou melhorar suas propriedades nutricionais (BRASIL, 1997).

A principal discussão sobre o emprego de aditivos na produção de alimentos resulta da controvérsia entre a necessidade e a segurança de seu uso. Embora sob o ponto de vista tecnológico haja benefícios alcançados com a utilização de aditivos alimentares, existe a preocupação constante quanto aos potenciais riscos toxicológicos decorrentes da ingestão diária dessas substâncias químicas. Desta forma, antes de ser autorizado o uso de um aditivo em alimentos, este deve ser submetido a uma avaliação toxicológica adequada, em que se deve levar em conta, dentre outros aspectos, qualquer efeito acumulativo, sinérgico e de proteção, decorrente do seu uso. Estas substâncias devem ser reavaliadas quando necessário, à luz do conhecimento científico disponível e caso se modifiquem suas condições de uso (ANVISA, 2019).

O uso dos aditivos é limitado a certos alimentos, em condições específicas e ao menor nível para alcançar o efeito desejado para que a ingestão do aditivo não supere os valores de IDA, sendo proibido o uso em alimentos quando: houver evidências de que o mesmo não é seguro para consumo pelo homem; se interferir sensível e desfavoravelmente no valor nutritivo do alimento; servir para encobrir falhas no processamento e/ou nas técnicas de manipulação; encobrir alteração ou adulteração da matéria-prima ou do produto já elaborado; induzir o consumidor a erro, engano ou confusão; quando não estiver autorizado por legislação específica (BRASIL, 1997).

A legislação brasileira sobre aditivos alimentares estabelece que um aditivo possa ser utilizado pela indústria alimentícia somente quando estiver explicitamente definido em legislação específica para a categoria de alimentos correspondente, com as respectivas funções e limites. Embora muitos aditivos desempenhem individualmente mais do que uma função, para fins de classificação e regulação, estas substâncias são agrupadas de acordo com a sua função primária em: conservante, corante, antioxidante, edulcorante, agente de massa, antiespumante, antiemectante, espessante, geleificante, estabilizante, aromatizante, umectante, regulador de acidez, acidulante, emulsificante, melhorador de farinha, realçador de sabor, fermento químico, glaceante, agente de firmeza, sequestrante, estabilizante de cor e espumante.

De forma a harmonizar a identificação dos aditivos, os mesmos são categorizados pelo Sistema Internacional de Numeração de Aditivos Alimentares (INS, do Inglês *International Numbering System*). Este sistema foi elaborado pelo CCFAC para estabelecer um sistema numérico internacional de identificação dos aditivos alimentares nas listas de ingredientes como alternativa à declaração do nome específico do aditivo. Sendo assim, é possível observar nos rótulos dos alimentos informações sobre os aditivos que são utilizados, seja pelo nome completo ou pelo número INS. Um resumo dos principais aditivos empregados nos alimentos, com seus respectivos números INS pode ser observado na Figura 1.

Figura 1. Classificação dos aditivos alimentares de acordo com a função que desempenham nos alimentos



Entre as diferentes classes de aditivos empregadas nos alimentos processados, podemos destacar os conservantes, que de acordo com o item 3.6 da Portaria n° 540 – SVS/MS são substâncias que impedem ou retardam a alteração dos alimentos provocada por microrganismos ou enzimas (BRASIL, 1997).

3.2. Conservantes

Um dos principais problemas enfrentados pela indústria alimentícia é a preservação dos seus produtos. De acordo com a WHO, 20% dos alimentos produzidos são perdidos devido à deterioração (BROWN, 2018). Diferentes processos são empregados com o intuito de preservar os alimentos, como refrigeração, secagem, congelamento, aquecimento, ou, mais comum em alimentos processados, pela adição de conservantes (CAROCHO *et al.*, 2015). Utilizados na indústria alimentícia para manter as características de sabor, consistência e aparência dos alimentos, os conservantes têm como função prevenir ou inibir o crescimento microbiano e evitar alterações químicas indesejáveis, mantendo a qualidade dos produtos e aumentando seu tempo de vida útil (AMIRPOUR *et al.*, 2015).

A indústria alimentícia tem se deparado com um desafio no que diz respeito à conservação de alimentos. Ao mesmo tempo em que existem restrições impostas pelas legislações relativas ao uso de aditivos e consumidores cada vez mais exigentes, que desejam produtos de elevada qualidade e sem aditivos, por outro lado, aumenta a demanda por alimentos processados, cuja conservação requer o uso de aditivos (SAAD *et al.*, 2005; ZHAO *et al.*, 2013).

Desde a antiguidade, diversos compostos químicos são utilizados com o intuito de preservar os alimentos. Sal, açúcar, álcool, fumaça, condimentos, além de ácidos orgânicos, como os ácidos láctico e acético, têm sido considerados conservantes tradicionais (LÜCK e JAGER, 2000). A maior ameaça vem da deterioração ou mesmo da toxicidade dos produtos alimentícios, devido à ação de microrganismos nocivos, como bactérias, leveduras e bolores, que podem secretar toxinas, perigosas para a saúde humana e que podem ser fatais (AMIT *et al.*, 2017).

Segundo a resolução nº 04/88 do Ministério da Saúde (BRASIL, 1988), com a modificação sugerida pela resolução da Diretoria Colegiada nº 08/08 (BRASIL, 2008), os conservantes permitidos para uso no Brasil são apresentados na Tabela 1, juntamente com os seus códigos INS e os principais usos.

Entre os conservantes mais utilizados nos alimentos, podemos destacar o ácido sórbico e seus sais (sorbatos), o ácido benzoico e seus sais (benzoatos) e o ácido *p*-hidroxibenzóico e seus ésteres (parabenos). Essas substâncias têm sido utilizadas por muito tempo como conservantes, por serem consideradas seguras para uso desde que sejam respeitados os níveis máximos permitidos.

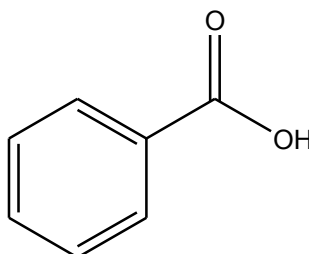
Tabela 1. Conservantes permitidos no Brasil e suas principais aplicações

Conservantes	INS	Principais aplicações
Ácido sórbico e seus sais de sódio, cálcio e potássio	200-203	Queijos, laticínios, carnes, produtos a base de peixe, pão e produtos de confeitaria
Ácido benzoico e seus sais de sódio, potássio e cálcio	210-213	Bebidas carbonatadas, geleias, doces, margarinas e molhos
Metilparabeno, Etilparabeno e seus sais de sódio	214-215, 218-219	Bebidas fermentadas, não carbonatadas e adoçantes de mesa líquido
Dióxido de enxofre; sulfito de sódio, potássio e cálcio; bissulfito de sódio, cálcio e potássio; metabissulfito de sódio e potássio	220-228	Vinhos
Nisina	234	Queijos processados
Natamicina	235	Queijos processados
Nitrito de potássio e sódio	249-250	Embutidos
Nitrato de sódio e potássio	251-252	Embutidos
Propionato de sódio, cálcio e potássio	281-283	Produtos de panificação

3.2.1. Ácido benzoico e seus sais - benzoatos

O ácido benzoico (Figura 2) foi um dos primeiros conservantes permitidos pela Agência Norte Americana de Administração de Alimentos e Drogas (FDA, do inglês *United States Food and Drug Administration*). Sua ação conservante foi descrita pela primeira vez por H. Fleck em 1875, na tentativa de obter um substituto ao ácido salicílico. Entretanto, devido à dificuldade na sua obtenção na época, seu uso na conservação de alimentos só foi introduzido ao final do século 19. É um dos conservantes alimentícios mais usados no mundo, em função de seu baixo custo de produção, fácil incorporação nos alimentos, baixa toxicidade e o fato de ser incolor (CHIPLEY, 2005). Embora o ácido benzoico não dissociado seja o agente antimicrobiano mais efetivo, usam-se preferencialmente os seus sais de sódio, cálcio ou potássio, devido a maior solubilidade (BILAU *et al.*, 2008). Os benzoatos são identificados pelos códigos INS 210 a 213.

Figura 2. Estrutura química do ácido benzoico



Como todos os conservantes orgânicos, sua eficiência depende do pH e seu uso somente é recomendado para produtos com pH inferior a 4,2. Quanto mais baixo o pH do alimento a ser conservado, menor é a concentração de ácido benzoico necessária para a ação conservante. Esse bactericida e fungicida é efetivo somente em meio levemente ácido e usado em muitos casos em combinação com outros conservantes, como sorbatos, dióxido de enxofre, parabenos e dióxido de carbono, devido aos efeitos sinérgicos obtidos ampliando o espectro de ação e atividade antimicrobiana (CHIPLEY, 2005).

Nos alimentos, os benzoatos atuam na inibição de fungos e leveduras, uma vez que o pH baixo dos alimentos aos quais ele é aplicado é suficiente para inibir o crescimento bacteriano (CHIPLEY, 2005). A concentração mínima para inibição de microrganismos é dependente de fatores como tipo de substrato, pH do meio e microrganismo de interesse. Usualmente, concentrações entre 20 e 500 ppm são suficientes para inibir o crescimento de fungos e leveduras (LÜCK e JAGER, 2000).

Ao contrário do ácido sórbico, o ácido benzoico é ativo contra os lactobacilos, o que impede seu uso em produtos fermentados, como iogurtes, por exemplo. Por conferir gosto forte e apimentado, o que corresponde a um impacto sensorial negativo, seu uso é restrito a certo número de produtos e, um dos seus maiores mercados é como conservante alimentício em bebidas carbonatadas. Os benzoatos também são usados em salada de frutas, geleias, doces, margarinas, balas, tortas de fruta, molhos, etc (BILAU *et al.*, 2008).

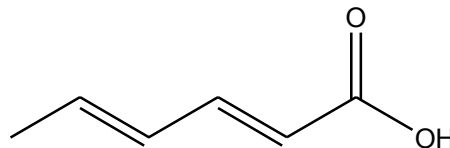
Existem diversos mecanismos para a síntese do ácido benzoico, porém, industrialmente, este é obtido pela oxidação em fase líquida do tolueno (WHO, 2000). Na natureza, ele ocorre em várias plantas como um metabólito, em frutas, como mirtilos, uvas, morangos, tomates, maçãs, em algumas especiarias, como canela e cravo, no mel, em alguns cogumelos e chás. Também é observado em alguns produtos derivados do leite como subproduto da degradação microbiana do ácido hipúrico ou da fenilalanina presentes nestes produtos ou por oxidação do benzaldeído, durante a etapa de fermentação (WHO, 2000; CHIPLEY, 2005).

Do ponto de vista toxicológico, diversos testes em animais mostraram a baixa toxicidade dos benzoatos. Após a ingestão oral este conservante é rapidamente absorvido no trato gastrointestinal, onde é ativado e, posteriormente metabolizado no fígado, por conjugação à glicina, levando a formação de ácido hipúrico, que é excretado pela urina. Esta via é responsável por eliminar entre 66 a 95% do benzoato ingerido, evitando a sua acumulação no organismo (CHIPLEY, 2005). O principal efeito causado pelos benzoatos é o desenvolvimento de reações alérgicas em pessoas mais sensíveis, embora alguns estudos demonstrem também a capacidade do benzoato se converter a benzeno, substância altamente cancerígena, na presença de vitamina C (ZAMANI MAZDEH *et al.*, 2014).

3.2.2. Ácido sórbico e seus sais - sorbatos

O ácido sórbico (Figura 3) é um composto encontrado na natureza, tendo sido isolado pela primeira vez em 1859 pelo químico alemão W. Von Hofmann, a partir do fruto de *Sorbus aucuparia L.*. Entretanto, suas propriedades antimicrobianas só foram descobertas na década de 1930, por E. Miller e C. M. Gooding (LÜCK e JAGER, 2000; STOPFORTH *et al.*, 2005). O seu uso como conservante é amplo, devido a características como inocuidade e não interferir no sabor dos produtos, sendo empregado puro ou como um dos seus sais de sódio, cálcio e potássio, que são mais solúveis em água, e conseqüentemente, mais empregados (LÜCK e JAGER, 2000).

Figura 3. Estrutura química do ácido sórbico



O ácido sórbico e seus sais são conservantes identificados pelos códigos INS 200 a 203. Da mesma maneira que para os benzoatos, a atividade antimicrobiana dos sorbatos está relacionada com a presença da molécula não dissociada, sendo mais efetivos em alimentos ácidos ou acidificados (JAY, 1996). Assim, os sorbatos são utilizados em alimentos com pH inferior a 6,5 e de grande valor nutricional, tais como queijos, laticínios, carnes, produtos à base de peixe, pão e produtos de confeitaria.

Os sorbatos são inibidores de bolores e leveduras, embora também atuem na inibição de bactérias. A resistência das bactérias lácticas aos sorbatos, especialmente em pH 4,5 ou maior, permite o uso destes conservantes como agentes fungistáticos em produtos que sofrem fermentação láctica (JAY, 1996). Assim como para os benzoatos, a concentração mínima necessária para a inibição de microrganismos varia de acordo com fatores, como substrato, pH do meio e microrganismo de interesse, sendo usado de 10 a 10000 ppm (LÜCK e JAGER, 2000).

Do ponto de vista toxicológico, os sorbatos surgem como um dos conservantes que causa menos efeitos indesejáveis ao consumidor, o que pode ser explicado pelo seu mecanismo de absorção. O organismo humano metaboliza o ácido sórbico da mesma forma que os ácidos graxos insaturados (β -oxidação), formando CO₂, água e energia. Assim, a baixa toxicidade observada deve-se à degradação do conservante pelas vias metabólicas naturais do nosso organismo (TFOUNI e TOLEDO, 2002a).

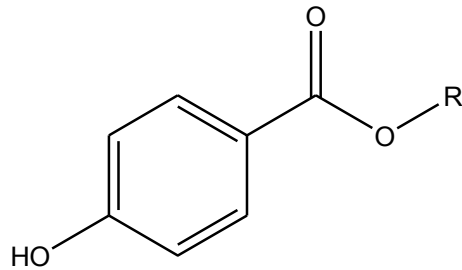
Adicionalmente, alguns estudos reportaram a ocorrência de interações entre o ácido sórbico e outros aditivos como, por exemplo, os nitritos presentes em carnes defumadas e embutidos, que podem dar origem a substâncias mutagênicas, ou a ocorrência de reações de escurecimento por um mecanismo não enzimático resultante da interação do conservante com compostos aminados, como a lisina e o glutamato (STOPFORTH *et al.*, 2005). Também são observadas para o ácido sórbico algumas reações alérgicas em indivíduos com elevada sensibilidade (TFOUNI e TOLEDO, 2002a).

3.2.3. Parabenos

Os parabenos (Figura 4) são uma classe de substâncias empregadas como conservantes, introduzidos em meados da década de 1920 em produtos farmacêuticos, embora nos dias atuais sejam amplamente utilizados em produtos cosméticos e alimentos. Eles são obtidos pela reação de esterificação do ácido *p*-hidróxibenzóico com o álcool apropriado na presença de um catalisador ácido, no qual o éster obtido varia desde cadeias alquílicas como metil, etil e propil, até substituintes aromáticos como benzil e fenil (BŁĘDZKA *et al.*, 2014).

Algumas características são fundamentais na popularidade dos parabenos como conservantes, dentre as quais, podemos destacar: amplo espectro de atividade contra leveduras, bolores e bactérias; estabilidade química em diferentes intervalos de pH e temperatura; inércia; baixo grau de toxicidade sistêmica; baixa frequência de sensibilização; boa solubilidade em água; uso relativamente seguro; baixo custo de produção; não ocasiona variações na consistência ou coloração dos produtos (SONI *et al.*, 2005; BŁĘDZKA *et al.*, 2014).

Figura 4. Estrutura química dos parabenos



Assim como os benzoatos e sorbatos, os parabenos apresentam maior atividade antimicrobiana na forma não dissociada. A esterificação do grupo carboxila do ácido *p*-hidroxibenzoico permite que os parabenos formados se apresentem na forma molecular em valores de pH de até 8,5, enquanto que a dissociação dos benzoatos e sorbatos ocorre em valores maiores que 5,0. Enquanto que o pH ótimo para a atividade antimicrobiana dos benzoatos e sorbatos é entre 2,5 a 4,0, os parabenos são eficientes entre 3,0 e 8,0 (DAVIDSON, 2005). A não dissociação destes compostos facilita a penetração das membranas celulares dos microorganismos, sobre os quais será exercida ação inibitória do agente conservante. Sua atividade antimicrobiana é diretamente proporcional ao comprimento da cadeia lateral e não aumenta com o abaixamento do pH na mesma intensidade que ocorre com os benzoatos e sorbatos (DAVIDSON, 2005; CARREIRA, 2008).

Embora por muito tempo os parabenos fossem classificados como uma classe de substância segura para uso, estudos recentes têm apontado para o potencial efeito dos parabenos no sistema endócrino (SONI *et al.*, 2005), além de efeito estrogênico (ROUTLEDGE *et al.*, 1998) e potencial carcinogênico (DARBRE *et al.*, 2004). Essas constatações despertaram o interesse das agências reguladoras a nível internacional, tanto que recentemente, o propilparabeno foi banido para uso como conservante em alimento (BRASIL, 2008), sendo permitidos apenas o metilparabeno e o etilparabeno, com restrições em relações aos benzoatos e sorbatos.

3.3. Ingestão Diária Aceitável

O JECFA utiliza a Ingestão Diária Aceitável (IDA) para expressar a segurança no uso de aditivos, o que representa a quantidade de substâncias que podem ser consumidas diariamente sem riscos para a saúde, mesmo por um longo período. A IDA é expressa em mg kg^{-1} do aditivo por peso corporal (WHO, 1987).

O processo de definição dos valores de IDA envolve a interpretação dos dados toxicológicos, identificando-se, quando possível, uma dose experimental na qual não tenham sido observados efeitos adversos da substância avaliada sobre a espécie animal mais sensível. Esta dose é conhecida como NOEL - *no observed effect level* (nenhum nível de efeito observado), sendo expressa em mg kg^{-1} peso corporal¹. Ela é utilizada para extrapolação dos resultados dos estudos experimentais com animais para o homem, sendo aplicado um fator de segurança arbitrário que considera diferenças de sensibilidade entre as espécies e a heterogeneidade da população humana. Para aditivos alimentares o JECFA tem empregado um fator de 100 (TFOUNI, 2000).

Os sorbatos apresentam valores de IDA entre 0-25 mg kg^{-1} , enquanto que para os benzoatos o IDA está entre 0-5 mg kg^{-1} . Para os parabenos, o JECFA sugere como IDA para a soma do metilparabeno e etilparabeno o valor de 0-10 mg kg^{-1} de peso corporal por dia (JECFA, 1974). Recentemente, o propilparabeno teve seu uso banido como conservante em alimentos. Além disso, níveis máximos de conservantes de até 3000 mg kg^{-1} para diferentes alimentos processados também são estabelecidos para garantir que a ingestão de um aditivo não exceda sua IDA (CODEX, 2017).

3.4. Avaliação da Ingestão Diária de Conservantes

A escolha do método a ser empregado na coleta de dados sobre consumo de alimentos depende de fatores como o objetivo da pesquisa, tamanho da amostra necessária e recursos disponíveis. Vários métodos são mencionados para obtenção das informações, entre eles: relatório sobre o balanço dos alimentos, diário detalhado sobre o consumo dos alimentos, pesagem de todo o alimento consumido,

entrevistas e questionários. Em geral, essas abordagens procuram obter informações sobre a dieta, que reflitam o padrão de consumo de indivíduos ou de grupos da população (TFOUNI, 2000).

Neste sentido, O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), através da Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF), realiza o estudo do consumo alimentar pessoal no Brasil, resultado de um amplo trabalho que tem por objetivo inferir sobre o perfil de consumo da população brasileira com 10 anos ou mais de idade. Esse estudo é fruto de parceria com o Ministério da Saúde que visou a investigação de temas de interesse específico na POF 2008-2009 e viabilizou, em particular, com o aporte dos recursos necessários e participações efetivas nas definições dos modelos metodológicos, o levantamento de um conjunto de informações que permitiram aprofundar análises sobre o estado nutricional da população brasileira (IBGE, 2011).

Na POF, as informações básicas utilizadas foram os registros detalhados dos alimentos consumidos pelos informantes ao longo de dois dias não consecutivos, independente do local de consumo do alimento, isto é, no domicílio ou fora dele. Os diferentes tipos de alimentos e as respectivas unidades de medidas utilizadas foram obtidos de forma direta, ou seja, por entrevista junto aos moradores com 10 anos ou mais de idade, residentes nos domicílios selecionados (IBGE, 2011).

O único modo de confirmar se um consumidor está definitivamente exposto a um risco seria medir precisamente a quantidade de aditivo presente no alimento a ser consumido e comparar com a IDA estabelecida para este aditivo, sendo esta, uma forma inviável. Para superar este problema, cálculos da estimativa da ingestão diária de aditivos são utilizados, pelos dados de consumo médio de alimentos (TFOUNI, 2000). Para tal são necessárias informações sobre a concentração das substâncias nos alimentos. É neste ponto que o uso de métodos analíticos eficientes se faz necessário.

3.5. Métodos analíticos para a determinação de conservantes em alimentos

Por mais que a concentração de conservantes em alimentos seja elevada e as técnicas instrumentais de análise tenham se modernizado nos últimos anos,

realizar a sua determinação de forma direta, principalmente quando é levada em consideração a complexidade das amostras de alimentos é uma tarefa árdua. Assim, a etapa de preparo de amostra continua sendo de extrema importância na obtenção de resultados confiáveis. Ela é responsável por promover a extração e o enriquecimento dos analitos e a remoção, tanto quanto possível, dos interferentes, além de tornar a amostra compatível com a técnica de determinação a ser utilizada (PRESTES *et al.*, 2009).

Na literatura são encontrados diversos métodos para a determinação de conservantes em alimentos, empregando técnicas como a Extração Líquido-Líquido (LLE, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*), Extração em Fase Sólida (SPE, do inglês *Solid-Phase Extraction*), Extração em Fase Sólida Dispersiva (DSPE, do inglês *Dispersive Solid-Phase Extraction*), Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*) e o método QuEChERS (do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*), e as técnicas instrumentais de análise de cromatografia líquida (CHEN *et al.*, 2012; FUSELLI *et al.*, 2012; KAMANKESH *et al.*, 2013; LIN *et al.*, 2013; MA *et al.*, 2013; ZHAO *et al.*, 2013; AMIRPOUR *et al.*, 2015; DING *et al.*, 2015) e gasosa (ABEDI *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2016; DING *et al.*, 2018), devido a maior seletividade quando comparada com as demais técnicas instrumentais.

Também são encontrados diversos métodos oficiais que empregam a espectrofotometria como técnica de determinação. Estes métodos são baseados na medida de absorção em comprimentos de onda entre 225 a 255 nm de um extrato etéreo ou de um destilado contendo os conservantes. Embora o procedimento de leitura seja rápido, a precisão é afetada, uma vez que podem ocorrer erros na leitura quando mais de um conservante está presente no extrato final, devido à sobreposição dos espectros de absorção. Além disso, a presença de interferentes pode levar a erros de superestimação dos resultados (TFOUNI, 2000).

3.5.1. Métodos oficiais para a determinação de conservantes em alimentos

O *Codex Alimentarius*, através do guia CXS 234-1999, revisado no ano de 2018, recomenda métodos oficiais para a determinação de conservantes em alimentos, de diferentes organizações internacionais como a ISO, AOAC e NMKL (CODEX, 1999). No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

(MAPA) disponibiliza um manual de métodos oficiais para análise de alimentos de origem animal (BRASIL, 2017). Como característica geral, podemos destacar o escopo limitado dos métodos oficiais, além de outras desvantagens, como múltiplas etapas de extração, uso de grandes volumes de solventes orgânicos e geração de grandes quantidades de resíduos.

Entre os métodos recomendados pelo *Codex Alimentarius* podemos destacar os métodos ISO 5518 e 6560, para a determinação de ácido benzoico e seus sais em sucos de fruta e néctares, em baixas (ISO, 2007) e altas concentrações (ISO, 1983), respectivamente, além do ISO 5519, para determinação do ácido sórbico e seus sais nas mesmas matrizes (ISO, 2008a). De maneira geral, todos estes métodos apresentam as desvantagens de serem realizados em múltiplas etapas, empregarem grandes quantidades de solventes e reagentes, alguns tóxicos, e o escopo limitado a poucos tipos de amostras e analitos, sendo pouco práticos para análises de rotina. Além disso, as determinações espectrofotométricas, que são utilizadas nestes métodos, não apresentam a seletividade das determinações cromatográficas.

Para superar as limitações dos métodos espectrofotométricos, outros métodos ISO empregando determinações por cromatografia estão disponíveis, embora não constem na lista de recomendações do *Codex Alimentarius*. O método ISO 22855 para determinação de benzoato e sorbato em sucos de frutas e vegetais consiste da diluição de 5,0 a 10,0 mL de amostra em aproximadamente 75 mL de uma solução de tampão acetato pH 3,4 e metanol (60:40, v/v) em um frasco volumétrico de 100 mL, que é levado ao banho ultrassônico por 10 minutos. Então, 1,0 mL das soluções Carrez I (hexacianoferrato de potássio) e II (sulfato de zinco) são adicionados para clarificação da amostra. Por fim, a amostra é diluída até o volume do frasco, filtrada em papel filtro e em seguida em filtro de membrana, para posterior análise por HPLC-UV (ISO, 2008c). O método ISO 9231 para determinação de benzoato e sorbato em leite e derivados é realizado pela pesagem de 3,0 a 20,0 g, de acordo com a amostra, em um frasco volumétrico de 100 mL, onde são adicionados 25 mL de uma solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹. A amostra é colocada em um banho ultrassônico a 70 °C por 15 minutos, seguido do ajuste do pH a 8 ± 1 com solução de H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹ e adição de 2 mL das soluções Carrez I e II para

precipitação de gorduras e proteínas. Por fim, a amostra é diluída com metanol, seguida da filtração com membrana e determinação por HPLC-UV (ISO, 2008b).

Embora os métodos ISO 22855 e 9231 sejam capazes de determinar os conservantes sorbato e benzoato simultaneamente em sucos de frutas e vegetais e leite e derivados, eles ainda são empregados em múltiplas etapas. Além disso, estes métodos geram grandes volumes de resíduos, uma vez que até 100 mL de solução metanólica são gerados por cada réplica analisada. Além disso, outros alimentos processados que contem conservantes em sua composição não são contemplados por estes métodos.

A AOAC estabelece dois métodos oficiais de análise para a determinação de conservantes em alimentos. O método 960.38, baseado na determinação espectrofotométrica de benzoato em alimentos não sólidos (como molhos e geleias) e bebidas (como sucos e refrigerantes) é um método bastante tedioso. Este procedimento é realizado em múltiplas etapas, apresenta baixa seletividade relacionada à técnica de determinação e escopo limitado (AOAC, 1964). O método 983.16 para determinação de benzoato e sorbato em alimentos sólidos, recomendado pelo *Codex Alimentarius* para a determinação de benzoato em frutas e vegetais processados (CODEX, 1999), envolve uma etapa de extração com éter em solução de NaOH e diclorometano, etapa de derivatização e determinação por Cromatografia Gasosa com detecção por Chama (AOAC, 1983). Embora este método supere a falta de seletividade do método espectrofotométrico, ele ainda consome muito tempo, levando cerca de 2,5 horas para completar a análise de uma única amostra, além de utilizar em seu preparo um solvente clorado, sendo este um método perigoso tanto ao meio ambiente quanto ao analista.

Um dos métodos recomendados pelo *Codex Alimentarius* da NMKL é o método 124, para a determinação cromatográfica de benzoato, sorbato e parabenos em sucos de fruta e néctares. O método prevê uma extração com mistura de metanol e água, seguido de filtração e separação em coluna de C18, com detecção no UV a 235 nm (NMKL, 2007). Embora este método apresente em seu escopo a determinação dos parabenos, para tal, dois conjuntos de fase móvel se fazem necessários: um para a determinação do sorbato e benzoato e outro para os parabenos, sendo esta uma desvantagem. Além disso, de forma similar aos demais métodos oficiais elencados, seu escopo é limitado a algumas amostras líquidas.

3.5.2. Métodos inovadores para determinação de conservantes em alimentos e a química analítica verde

Tendo em vista as desvantagens apresentadas pelos métodos oficiais de análise para a determinação de conservantes em alimentos, diversos autores têm se dedicado ao desenvolvimento de métodos inovadores de extração. Uma descrição mais detalhada dos diferentes trabalhos empregando estas técnicas pode ser observada na Tabela 2.

Tabela 2. Revisão de trabalhos que realizaram o desenvolvimento de métodos para a determinação de conservantes em alimentos

Técnica de preparo de amostras	Analitos	Matriz	Massa/volume de amostra	Técnica de determinação	Recuperações	Referência
LLE	Benzoato e sorbato	Refrigerante, suco de fruta, margarina, iogurte e queijo	Refrigerante – 200 mL Suco de fruta – 1 mL Margarina, iogurte e queijo – 5 g	HPLC-UV	86,1-102,2%	(TFOUNI e TOLEDO, 2002a)
USALLE ^a	Benzoato, sorbato, metilparabeno e propilparabeno	Refrigerante, geleia, molhos, frutas e vegetais enlatados,	1 g	HPLC-UV	102-106%	(SAAD <i>et al.</i> , 2005)
LLE	Benzoato e sorbato	Vinhos e sidras	2 mL	HPLC-UV	99,3-101,2%	(MACHADO <i>et al.</i> , 2007)

^a USALLE – Extração Líquido-Líquido Assistida por Ultrassom, do inglês *Ultrasound Assisted Liquid-liquid Extraction*

Técnica de preparo de amostras	Analitos	Matriz	Massa/volume de amostra	Técnica de determinação	Recuperações	Referência
USALLE	Benzoato, sorbato, metilparabeno e propilparabeno	Refrigerante, suco concentrado, água gaseificada, adoçante e molho shoyu	1 g	CE ^b	98,8-104,9%	(PETRUCI <i>et al.</i> , 2011)
DSPE	9 aditivos alimentares	Vinho	1 mL	UFLC-MS/MS ^c	78,5-99,2%	(CHEN <i>et al.</i> , 2012)
USALLE	7 conservantes	Queijo	2 g	LC-MS/MS ^d	82-103%	(FUSELLI <i>et al.</i> , 2012)
DSPE	9 aditivos alimentares	Vinho	10 mL	HPLC-UV	80,1-97,1%	(ZHAO <i>et al.</i> , 2013)
SPE	6 aditivos alimentares	Leite em pó	2 g	HPLC-DAD ^e	89-103%	(MA <i>et al.</i> , 2013)

^b CE – Eletroforese Capilar, do inglês *Capillary Electrophoresis*, ^c UFLC-MS/MS – Cromatografia Líquida Ultra Rápida acoplada ao Detector por Espectrometria de Massas em Série, do inglês *Ultra-fast Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry*, ^d LC-MS/MS – Cromatografia Líquida acoplada ao Detector por Espectrometria de Massas em Série, do inglês *Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry*, ^e HPLC-DAD – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Detector por Arranjo de Diodos, do inglês *High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector*

Técnica de preparo de amostras	Analitos	Matriz	Massa/volume de amostra	Técnica de determinação	Recuperações	Referência
DLLME	Benzoato e sorbato	logurte	2 mL	HPLC-UV	91-105%	(KAMANKESH <i>et al.</i> , 2013)
SCSE ^f	Benzoato, sorbato e ácido cinâmico	Sucos e refrigerantes	10 mL	HPLC-UV	63-107%	(LIN <i>et al.</i> , 2013)
QuEChERS	43 aditivos alimentares	Leite e derivados	15 g	UHPLC-MS ^g	89,4-108,2%	(JIA <i>et al.</i> , 2014)
DLLME	Benzoato e sorbato	Derivados de leite	1 g – sólidos 2 g - líquidos	GC-FID ^h	88,0-103,7%	(ABEDI <i>et al.</i> , 2014)
LLE	Benzoato e sorbato	logurte	10 mL	HPLC-UV	97-101%	(ZAMANI MAZDEH <i>et al.</i> , 2014)
LLE	Benzoato e sorbato	Molho <i>shoyu</i>	1 g	HPLC-UV	96,1-104,3%	(DING <i>et al.</i> , 2015)
DLLME	Benzoato e sorbato	Refrigerante, leite, ketchup e pão	Refrigerante – 5 mL Leite – 1 mL Ketchup e pão – 5 g	HPLC-UV	101-106%	(JAVANMARDI <i>et al.</i> , 2015)

^f SCSE – Extração Sortiva em Massa de Agitação, do inglês *Stir Cake Sorptive Extraction*, ^g UHPLC-MS – Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência acoplada ao Detector por Espectrometria de Massas, do inglês *Ultra High Performance Liquid Chromatography with Mass Spectrometry Detector*, ^h GC-FID – Cromatografia Gasosa acoplada ao Detector de Ionização em Chama, do inglês *Gas Chromatography with Flame Ionization Detector*

Técnica de preparo de amostras	Analitos	Matriz	Massa/volume de amostra	Técnica de determinação	Recuperações	Referência
LLE	Benzoato e sorbato	Suco de laranja, refrigerante e ketchup	Suco de laranja e refrigerante – 1 mL Ketchup – 20 g	HPLC-UV e LC-MS/MS	89-96%	(GÖREN <i>et al.</i> , 2015)
LLE	Benzoato e sorbato	Picles, molho de tomate, geleias, refrigerantes, sucos de frutas e derivados de leite	10 g – sólidos 10 g – líquidos	HPLC-UV	96,0-102,1%	(AMIRPOUR <i>et al.</i> , 2015)
DLLME	4 parabenos	Leite materno, molho de tomate, picles, suco de frutas e sorvete	Leite materno, suco de frutas – 1,0 mL Molho de tomate – 0,5 g Picles – 75,0 g Sorvete – 5,0 g	CE	86,7-103,3%	(ALSHANA <i>et al.</i> , 2015)

Técnica de preparo de amostras	Analitos	Matriz	Massa/volume de amostra	Técnica de determinação	Recuperações	Referência
PLE ⁱ	4 parabenos e 3 filtros-UV	Frutos do mar	1 g	LC-MS/MS	80,6-107,8%	(HAN <i>et al.</i> , 2016)
MSPD	4 parabenos	Frutos do mar	0,5 g	GC-MS	75,0-116,1%	(DJATMIKA <i>et al.</i> , 2016)
LLE	9 conservantes	Diversos alimentos	2 g	HPLC-UV	81,7-102,5%	(SUGIURA e NAKAJIMA, 2017)
QuEChERS	Benzoato e sorbato	Derivados de leite	4 mL	LC-MS	81-112%	(SEFIDI <i>et al.</i> , 2018)
DLLME	7 conservantes	Biscoitos, sucos de frutas, bebidas, vinagre e molho shoyu	0,5 g	GC-MS ^j	88,7-110,5%	(DING <i>et al.</i> , 2018)
SLE ^k	17 conservantes e aminas biogênicas	Produtos de carne e peixe	2 g	LC-MS ^l	70-130%	(MOLOGNONI <i>et al.</i> , 2018)

ⁱ PLE – Extração com Líquido Pressurizado, do inglês *Pressurized Liquid Extraction*, ^j GC-MS – Cromatografia Gasosa acoplada ao Detector por Espectrometria de Massas, do inglês *Gas Chromatography with Mass Spectrometry*, ^k SLE – Extração Sólido-líquido, do inglês *Solid-liquid Extraction*, ^l LC-MS – Cromatografia Líquida acoplada ao Detector por Espectrometria de Massas

Técnica de preparo de amostras	Analitos	Matriz	Massa/volume de amostra	Técnica de determinação	Recuperações	Referência
DLLME	4 parabenos	Leite materno	1 g	UHPLC-MS/MS ^m	n.d. ⁿ	(GRECCO <i>et al.</i> , 2018)
VA-DLLME-SFO ^o	4 parabenos	Molho shoyu e produtos cosméticos	0,3 g	CapLC-UV ^p	n.d.	(CHEN <i>et al.</i> , 2018)
SALLE ^q	Benzoato, sorbato e 3 adoçantes artificiais	Sucos de frutas	3 mL	UHPLC-UV	85-122%	(TIGHRINE <i>et al.</i> , 2019)

^m UHPLC-MS/MS – Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência acoplada ao Detector por Espectrometria de Massas em Série, do inglês *Ultra High Performance Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry*, ⁿ n.d. – não determinado, ^o VA-DLLME-SFO – Microextração Líquido-líquido Dispersiva Assistida por Vórtex com Solidificação da Gota Orgânica Flutuante, do inglês *Vortex Assisted Dispersive Liquid-liquid Microextraction based on the Solidification of a Floating Organic Drop*, ^p CapLC-UV – Cromatografia Líquida Capilar acoplada ao Detector Ultravioleta, do inglês *Capillary Liquid Chromatography with Ultraviolet Detector*, ^q SALLE – Extração Líquido-líquido Assistida pelo efeito *Salting-out*, do inglês *Salting-out Liquid-liquid Extraction*

Cada técnica de preparo de amostras apresentada tem seus próprios méritos e a escolha do procedimento de extração depende de vários fatores, entre estes, custo, simplicidade de operação, tipo e quantidade de amostra, praticidade e disponibilidade. Além disso, técnicas que seguem os princípios da Química Analítica Verde são preferíveis na escolha do preparo de amostra. Os conceitos da Química Analítica Verde surgem da Química Verde nos anos 2000, com o objetivo de tornar as práticas de laboratórios menos impactantes ao meio ambiente, adotando alguns princípios de desenvolvimento sustentável para laboratórios analíticos (GAŁUSZKA *et al.*, 2013; MOHAMED, 2015).

Desta forma, no desenvolvimento de um método analítico, busca-se atender os seguintes princípios (GAŁUSZKA *et al.*, 2013):

1. Técnicas de análise direta devem ser empregadas para evitar o preparo de amostras;
2. Menor volume ou massa de amostra e número de amostras são preferíveis;
3. Medições *in situ* devem ser realizadas;
4. Integração de processos analíticos e operações para economia de energia e redução do consumo de reagentes;
5. Métodos automatizados e miniaturizados devem ser selecionados;
6. Derivatização deve ser evitada;
7. Geração de grandes volumes de resíduos deve ser evitada tal como o gerenciamento apropriado do resíduo deve ser providenciado;
8. Métodos multi-analitos e multi-parâmetros são preferíveis;
9. O uso de energia deve ser minimizado;
10. Reagentes obtidos de fontes renováveis são preferidos;
11. Reagentes tóxicos devem ser eliminados ou substituídos;
12. A segurança do analista deve ser aumentada.

Neste sentido, o Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos e Metais (LACOM), atua no desenvolvimento de métodos de preparo de amostras que atendam os princípios da Química Analítica Verde seguindo os critérios acima mencionados. Embora na prática seja muito difícil seguir todos os 12 princípios, busca-se atingir o máximo de requisitos possíveis.

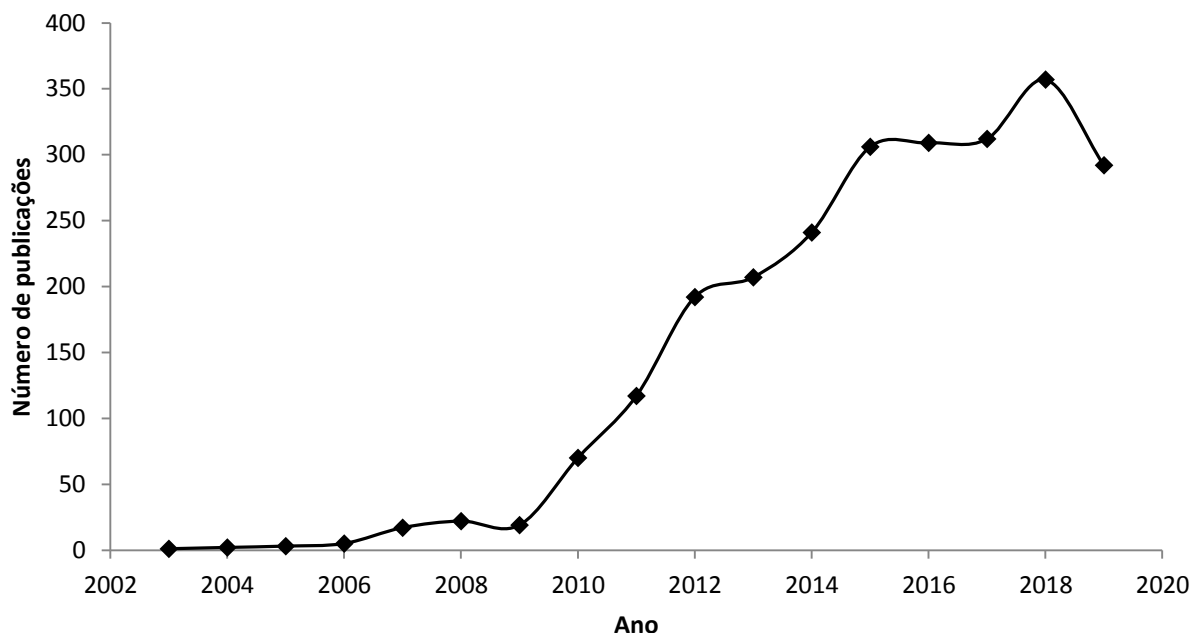
3.5.2.1. Método QuEChERS

Os químicos analíticos são continuamente desafiados a desenvolver métodos mais rápidos, ecológicos, exatos e precisos, capazes de garantir a qualidade, autenticidade, segurança e rastreabilidade dos compostos alvo numa diversidade de matrizes. Neste contexto, o método QuEChERS é um dos mais promissores, envolvendo quantidades reduzidas de solventes orgânicos e vidrarias, seguindo os princípios da química verde (PERESTRELO *et al.*, 2019).

Desenvolvido no ano de 2003 por Anastassiades e colaboradores, o método QuEChERS de preparo de amostras surgiu com o objetivo de superar as limitações práticas dos métodos multirresíduos de extração disponíveis na época (PRESTES, 2011). Conforme proposto pelos autores, seu nome vem das suas vantagens em ser um método rápido, fácil, barato, eficiente, robusto e seguro (do inglês **Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe**), sendo um procedimento dinâmico, capaz de ser realizado em qualquer laboratório (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

Embora tenha sido originalmente projetado para a extração de resíduos de agrotóxicos em frutas e vegetais, o método QuEChERS tem sido amplamente estudado para a determinação de diferentes compostos nas mais diversas matrizes, resultando em um número de publicações crescente a cada ano (Figura 5).

O método QuEChERS consiste das etapas de extração empregando como solvente a acetonitrila (MeCN), partição pela adição de sais e, por fim, uma etapa de limpeza do extrato empregando a DSPE. Durante o desenvolvimento do método QuEChERS os autores pretenderam descrever um método multirresíduo, que pudesse ser empregado tanto para a análise por LC quanto por GC. Desta forma, o uso de MeCN como solvente é adequado para ambas as técnicas cromatográficas, além de proporcionar a extração de diversos agrotóxicos com ampla faixa e polaridade e possibilitar menor extração de compostos lipofílicos presentes na matriz, como ceras, gorduras e pigmentos (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

Figura 5. Publicações envolvendo o método QuEChERS desde 2003

Fonte: SCOPUS, palavra chave: “QuEChERS”. Acessado em 17 de setembro de 2019.

A etapa de agitação do método QuEChERS pode ser realizada tanto de forma manual quanto com o auxílio dos agitadores do tipo vórtex. Esta é uma vantagem em comparação à agitação mecânica, permitindo que o procedimento seja realizado em qualquer lugar. Além disso, uma vez que o procedimento é realizado em frascos fechados, a exposição ao analista é minimizada. Também não há a necessidade de limpeza do homogeneizador entre as replicatas, tornando o método mais rápido (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

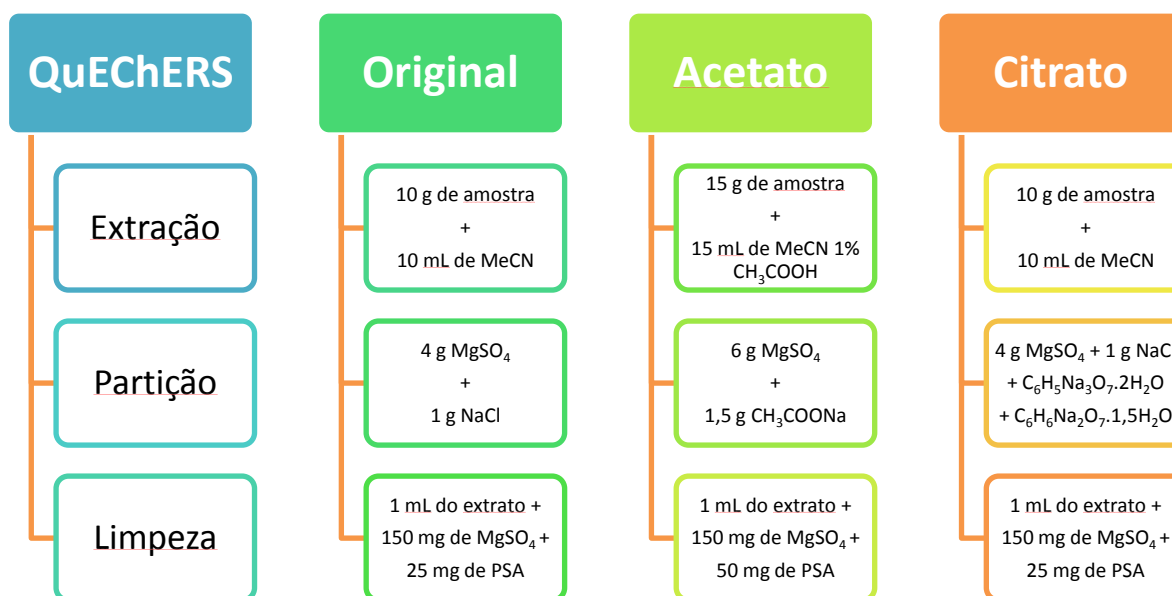
A etapa de partição, fundamental no método uma vez que é nela que ocorrerá a separação entre as fases aquosa e orgânica, é realizada empregando o efeito *salting-out*. No procedimento original descrito por Anastassiades e colaboradores são utilizados 4 g de $MgSO_4$ e 1 g de NaCl (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). Além da dispersão entre as fases, a adição de sais também auxilia no aumento da recuperação de analitos polares, pela redução da solubilidade destes analitos na fase aquosa (PRESTES *et al.*, 2009). O $MgSO_4$ foi escolhido no método QuEChERS devido a sua maior capacidade de hidratação quando comparado com os demais

sais testados, sendo esta uma reação exotérmica, tendo como resultado o aquecimento da amostra entre 40 – 45 °C, o que favorece a extração de compostos apolares (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

Por fim, a etapa de limpeza (*clean-up*) é realizada por DSPE, sendo esta uma etapa essencial para promover robustez e confiabilidade aos resultados obtidos pelo sistema cromatográfico, uma vez que componentes da matriz podem alterar a resposta do sistema (efeito matriz) e aumentar a frequência de manutenções necessárias. Para esta etapa, no procedimento original descrito por Anastassiades e colaboradores são empregados 25 mg do sorvente amina primária e secundária (PSA, do inglês *Primary Secondary Amine*) e 150 mg de MgSO₄. Desta forma, é realizada a limpeza dos extratos pela ação do sorvente PSA, que possui capacidade de retenção de ácidos graxos livres e outros compostos polares, e a redução da água residual (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

Com o objetivo de melhorar as recuperações para analitos sensíveis ao pH, foram propostos o emprego de sais acetato de acetato e citrato, para gerar um meio tamponado. No primeiro, a adição de acetato de sódio e ácido acético em proporções bem definidas geram a formação de um tampão de pH 4,8, sendo este método adotado pela AOAC como método oficial para determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos (AOAC, 2007; LEHOTAY, 2007). No segundo, a adição de sais citrato promovem o tamponamento na faixa de pH entre 5,0 e 5,5, sendo este método adotado como referência pelo Comitê Europeu de Normalização (ANASTASSIADES *et al.*, 2007; CEN, 2008). A Figura 6 representa as principais etapas dos métodos QuEChERS original, acetato e citrato.

Figura 6. Principais etapas dos métodos QuEChERS original, acetato e citrato.



De maneira geral, o QuEChERS é um método barato e flexível. Seus principais parâmetros podem ser facilmente modificados e otimizados para melhorar a eficiência de extração e aumentar sua aplicação potencial em uma ampla gama de diferentes campos e matrizes, sendo visto como uma alternativa confiável para a extração de uma diversidade de analitos de diferentes grupos químicos e matrizes (PERESTRELO *et al.*, 2019). Como pode ser observado na Tabela 3, os métodos QuEChERS original, acetato e citrato, além das suas várias modificações propostas nos últimos anos, têm sido aplicados para determinação de diferentes analitos nas mais variadas amostras.

Tabela 3. Exemplos de trabalhos que empregaram o método QuEChERS para determinação de diferentes compostos em amostras de alimentos

Análitos	Matriz	Procedimento	Técnica cromatográfica	Referência
Agrotóxicos e HMF ^a	Mel	QuEChERS modificado	LC-MS/MS	(TOMASINI <i>et al.</i> , 2012)
Agrotóxicos	Caldo de cana	QuEChERS modificado	LC-MS/MS	(SAMPAIO <i>et al.</i> , 2013)
Agrotóxicos	Pêssego	QuEChERS original	GC-MS	(COSTA <i>et al.</i> , 2014)
HPAs ^b	Arroz	QuEChERS acetato	GC-MS	(ESCARRONE <i>et al.</i> , 2014)
Micotoxinas	Farinha de trigo e farelo de trigo e arroz	QuEChERS modificado	HPLC-FLD ^c	(KUPSKI e BADIALE-FURLONG, 2015)
Medicamentos veterinários	Leite	QuEChERS modificado	LC-MS/MS	(ARIAS <i>et al.</i> , 2018)
Canabinoides	Mel	QuEChERS modificado	LC-MS/MS	(BRIGHENTI <i>et al.</i> , 2019)
Medicamentos veterinários	Frutos do mar	QuEChERS modificado	UPLC-MS/MS	(CHEN <i>et al.</i> , 2019)

^a HMF – Hidroximetilfurfural, ^b HPAs – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, ^c HPLC-FLD – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Detector de Fluorescência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detector*

Analitos	Matriz	Procedimento	Técnica cromatográfica	Referência
Parabenos e bisfenóis	Leite materno	QuEChERS modificado	LC-MS/MS	(DUALDE <i>et al.</i> , 2019)
Micotoxinas	Nozes	QuEChERS modificado	UHPLC-MS/MS	(HIDALGO-RUIZ <i>et al.</i> , 2019)
Piretroides	Peixe	QuEChERS modificado	GC-MS	(OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2019)
Fármacos	Peixe	QuEChERS original	LC-MS/MS	(PEÑA-HERRERA <i>et al.</i> , 2019)
HPAs	Mel	QuEChERS acetato	GC-MS	(PETROVIĆ <i>et al.</i> , 2019)
PFAs ^d	Leite e derivados	QuEChERS modificado	LC-MS/MS	(SZNAJDER-KATARZYŃSKA <i>et al.</i> , 2019)
HAAs ^e	Produtos de confeitaria	QuEChERS modificado	UHPLC-MS/MS	(WU <i>et al.</i> , 2019)
PBDEs ^f	Peixe	QuEChERS modificado	GC-ICP-MS/MS ^g	(ZHANG <i>et al.</i> , 2019)
Bisfenol A e análogos	12 categorias de alimentos	QuEChERS modificado	LC-MS/MS	(ZHOU <i>et al.</i> , 2019)

^d PFAs – Substâncias perfluoroalquílicas, do inglês *perfluoroalkyl substances*, ^e HAAs – Aminas heterocíclicas aromáticas, do inglês *heterocyclic aromatic amines*, ^f PBDEs – Éteres difenílicos polibromados, do inglês *polybrominated diphenyl ethers*, ^g GC-ICP-MS/MS – Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas Indutivamente Acoplado em série, do inglês *Gas Chromatography tandem inductively coupled plasma mass spectrometry*

A maioria das modificações associadas ao método QuEChERS incluem a otimização das massas de amostra, quantidade e combinação de solventes e sais, sorventes para a etapa de limpeza, modos de agitação e miniaturização dos reagentes em geral, seguindo os princípios da Química Verde (PERESTRELO *et al.*, 2019). Essas modificações indicam um futuro promissor na análise de compostos orgânicos em diferentes amostras (PRESTES, 2011).

3.5.2.2. Técnica SILLME de preparo de amostra

A técnica SILLME de preparo de amostras surgiu no ano de 2014, proposta por Du e colaboradores para a determinação de fluoroquinolonas em água, alimentos e matrizes biológicas (DU *et al.*, 2014). Esta se apresenta como uma modificação da técnica de Extração Líquido-líquido assistida pelo efeito *Salting-out* (SALLE, do inglês *Salting-out Assisted Liquid-liquid Extraction*), desenvolvida em 1973 para a extração de metais quelatos em amostras aquosas (MATKOVICH e CHRISTIAN, 1973). Estas técnicas são baseadas no fenômeno de separação de fases induzida pelo efeito *salting-out*. A fase orgânica é separada a partir de uma solução aquosa homogênea e simultaneamente os analitos são extraídos quando sais orgânicos ou inorgânicos são adicionados (MORENO-GONZÁLEZ e GARCÍA-CAMPAÑA, 2017).

Além da SALLE, existem diferentes variações da técnica de LLE com o objetivo de substituir o uso de solventes apolares e minimizar os procedimentos, pelo uso de menores quantidades de solventes e amostra. Podemos destacar as técnicas de Microextração Líquido-líquido Dispersiva (DLLME, do inglês *Dispersive Liquid-liquid Microextraction*), Microextração Líquido-líquido Assistida por Vórtex (VALLME, do inglês *Vortex Assisted Liquid-liquid Microextraction*) e as variações da técnica empregando o efeito *salting-out*, como a própria SILLME e a SALLME (Microextração Líquido-líquido Assistida pelo efeito *Salting-out*, do inglês *Salting-out Assisted Liquid-liquid Microextraction*).

Na técnica de DLLME empregada da forma tradicional (REZAEI *et al.*, 2006), uma mistura apropriada dos solventes extrator e dispersor é injetada na amostra com o auxílio de uma seringa. Após agitação, ocorre a formação de uma solução turva com microgotas do solvente extrator, contendo os analitos extraídos. Após

centrifugação, ocorre a formação de uma fase sedimentada, que pode ser recolhida com o auxílio de uma seringa para posterior determinação pela técnica mais apropriada (REZAEI *et al.*, 2010). Diversas modificações foram propostas a esta técnica, envolvendo o uso de solventes menos agressivos ao analista e ao meio ambiente.

Na VALLME, também são utilizados solventes imiscíveis com a água, sejam eles menos densos (1-hexanol, 1-octanol, ácido hexanoico, tolueno, etc.), mais densos (diclorometano, clorobenzeno, tetracloreto de carbono, etc) ou mesmo líquidos iônicos. Entretanto, a dispersão é realizada por auxílio do agitador do tipo vórtex, não sendo necessário o solvente dispersor (BOSCH OJEDA e SÁNCHEZ ROJAS, 2014).

Uma das principais vantagens da SALLE quando comparada com as demais variações da LLE é a possibilidade de uso de solventes relativamente polares como MeCN, metanol ou acetona. Como consequência, a eficiência de extração de compostos polares é melhorada em comparação a LLE empregando solventes apolares (MORENO-GONZÁLEZ e GARCÍA-CAMPAÑA, 2017). Outra vantagem desta técnica é que a área de contato entre as fases aquosa e orgânica é praticamente infinita quando comparada com a LLE, VALLME e DLLME. Isto se deve ao fato de os solventes empregados na SALLE serem miscíveis com a água em qualquer proporção, o que facilita a transferência de massa e, conseqüentemente, a extração (KOLTSAKIDOU *et al.*, 2015). Além disso, o uso de solventes polares torna este método de preparo de amostras compatível com as técnicas de LC e GC.

Na SILLME proposta em 2014, 1 mL de MeCN é adicionado a 5 mL da solução contendo a amostra, seguidos de rápida agitação em vórtex; após, 2 g de MgSO₄ são adicionados e a amostra é agitada em vórtex por 3 minutos. O sobrenadante é transferido para um tubo de vidro de 10 mL, onde é submetido à secagem em fluxo de nitrogênio em banho aquecido a 40 °C. O resíduo é redissolvido em 400 µL da fase móvel, agitado em vórtex e filtrado em membrana, estando pronto para análise cromatográfica (DU *et al.*, 2014). Estas etapas estão representadas na Figura 7.

Figura 7. Principais etapas da SILLME empregada por Du et al., 2014



Embora os autores proponham diferentes nomes para as técnicas, como as próprias variações da SALLE, a SALLME e a SILLME, todas estas apresentam o mesmo princípio: partição do solvente extrator altamente miscível com a fase aquosa pelo efeito *salting-out*. Estas técnicas mencionadas têm sido aplicadas na determinação de diferentes compostos orgânicos nas mais variadas matrizes, conforme pode ser observado na Tabela 4.

Podemos observar que a MeCN é o solvente mais empregado para os métodos de extração envolvendo a SALLE. Isto se deve a elevada solubilidade deste solvente em água, oferecendo ampla capacidade de extração de compostos de diferentes polaridades, além da sua capacidade de atuar na precipitação de proteínas, diferentemente dos demais solventes polares avaliados, como acetona e metanol. Também é um solvente compatível com as diferentes técnicas de determinação apresentadas. Desta forma, este método de extração apresenta a versatilidade necessária para ser empregado na determinação de conservantes em alimentos.

Tabela 4. Exemplos de trabalhos que empregaram técnicas derivadas da SALLE para determinação de compostos orgânicos em diferentes matrizes

Técnica	Analitos	Matriz Volume/ massa de amostra	Solvente extrator Volume	Sal Massa	Técnica de determinação	OBS	Referência
SALLE	Sinvastatina e sinvastatina ácida	Plasma humano 100 µL	MeCN 200 µL	Tampão formiato de amônio pH 4,5 50 µL	LC-MS/MS	Procedimento automatizado	(ZHANG <i>et al.</i> , 2010)
SALLE	Anti- inflamatórios	Água 2,5 mL	Acetato de etila 1,5 mL	NaCl 0,40 g	GC-MS	-	(NOCHE <i>et al.</i> , 2011)
SALLE	Corantes	Águas residuais e alimentos 5,5 mL e 1,0 g	MeCN 4,5 mL	(NH ₄) ₂ SO ₄ 2,25 g	UV-Vis ^a	-	(RAZMARA <i>et al.</i> , 2011)
SILLME	6 fluoroquinolonas	Água, mel, leite e plasma e músculo suíno 5 mL	MeCN 1 mL	MgSO ₄ 2 g	HPLC-FLD	Evapora, reconstitui e filtra a amostra	(DU <i>et al.</i> , 2014)

^a UV-Vis – Espectrofotometria da Região do Ultravioleta-Visível

Técnica	Analitos	Matriz Volume/ massa de amostra	Solvente extrator Volume	Sal Massa	Técnica de determinação	OBS	Referência
SALLE	Herbicidas sulfonilureia	Água e suco de banana 2 e 4 mL	MeCN 1 mL	(NH ₄) ₂ SO ₄ 1,6 g	HPLC-DAD	Evapora, reconstitui e filtra a amostra	(GURE <i>et al.</i> , 2014)
SALLE	Sulfanilamida	Chá, água, leite, mel, urina, plasma e sangue 0,5 mL	MeCN 250 µL	NaCl 250 mg mL ⁻¹	HPLC-UV	Procedimento em seringa	(SERESHTI <i>et al.</i> , 2014)
SALLE	Carbamato de etila	Bebidas destiladas 1 mL diluída (1:1, v/v)	MeCN 2 mL	NaCl 0,25 g	HPLC-FLD	-	(VALENTE <i>et al.</i> , 2014)
SALLE	Homólogos da vitamina K	Plasma humano 0,5 mL	MeCN 1 mL	MgCl ₂ 0,3 g	HPLC-FLD	-	(AHMED e MAHMOUD, 2015)
SALLE	HPAs	Mel 5 mL – 250 g L ⁻¹ de mel	MeCN 1,7 mL	NaCl 1 g	UPLC-FLD	Apenas filtra a amostra	(KOLTSAKIDOU <i>et al.</i> , 2015)

Técnica	Analitos	Matriz Volume/ massa de amostra	Solvente extrator Volume	Sal Massa	Técnica de determinação	OBS	Referência
SALLE	Anandamida	Plasma humano 100 µL	MeCN 200 µL	Tampão formiato de amônio 5 M 50 µL	LC-MS/MS	-	(XIONG <i>et al.</i> , 2015)
SALLE	Naringerina	Sucos de frutas 5 mL	MeCN 1,7 mL	(NH ₄) ₂ SO ₄ 1,0 g	HPLC-DAD	Evapora, reconstitui e filtra a amostra	(MAGIERA e KWIETNIOWSKA, 2016)
SALLE	β-bloqueadores e metabólitos	Urina 500 µL	MeCN 300 µL	(NH ₄) ₂ SO ₄ 200 mg	UHPLC-UV	-	(MAGIERA <i>et al.</i> , 2016)
SALLE	5 tetraciclinas	Alimentos infantis 1 g	MeCN 3,2 mL	(NH ₄) ₂ SO ₄ 1,25 g	UHPLC-MS/MS	Evapora, reconstitui e filtra a amostra	(MORENO-GONZÁLEZ e GARCÍA-CAMPAÑA, 2017)
SALLE	7 inseticidas piretroides	Urina, água do mar e água residual 2 mL	MeCN 2,0 mL	NaCl 5 mol L ⁻¹ 4 mL	GC-MS	Filtra a amostra antes da análise	(NIU <i>et al.</i> , 2017)

Técnica	Analitos	Matriz Volume/ massa de amostra	Solvente extrator Volume	Sal Massa	Técnica de determinação	OBS	Referência
SALLE	Fármacos	Plasma, urina e água de lago 1 mL	ACN 0,4-0,5 mL	NaOH 48-360 mg	HPLC-UV	-	(ALSHISHANI <i>et al.</i> , 2018)
SALLME	Tetraciclina	Urina 1 mL	Octilamina 50 µL	NaCl 20 %, 300 µL	HPLC-UV	Procedimento automatizado	(CHERKASHINA <i>et al.</i> , 2018)
SALLE	Ocratoxina A	Cerveja 6 mL	Tolueno e Acetona 1,5 mL e 3,5 mL	(NH ₄) ₂ SO ₄ 1 g	UHPLC-MS/MS	Evapora, reconstitui e filtra a amostra	(MARIÑO-REPISO <i>et al.</i> , 2018)
SALLE	Paraquat	Água, solo e vegetais 10 mL	ACN 2,5 mL	NaCl 3,5 g	HPLC-UV	Realiza DLLME após a SALLE	(RASHIDIPOUR <i>et al.</i> , 2018)
SALLE	Benzimidazois	Leite 4 g	ACN 2 mL	(NH ₄) ₂ SO ₄ 1,6 g	CapLC-UV	Evapora, reconstitui e filtra a amostra	(TEJADA-CASADO <i>et al.</i> , 2018)
SALLE	Corantes e conservantes	Sucos de frutas 3 mL	Acetona:Etanol 1:1 (v:v) 0,5 mL	(NH ₄) ₂ SO ₄ 1,7 g	UPLC-UV	Evapora e reconstitui a amostra	(TIGHRINE <i>et al.</i> , 2019)

4. MATERIAL E MÉTODOS

O desenvolvimento experimental deste trabalho consistiu na padronização e validação de métodos para a determinação de conservantes em alimentos processados.

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos e Metais (LACOM), lotado na Escola de Química e Alimentos (EQA) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). As análises cromatográficas para a determinação de conservantes em alimentos foram realizadas no Laboratório de Cromatografia do Centro Integrado de Análises da FURG (CIA-FURG).

4.1. Conservantes selecionados para estudo

Foram selecionados para estudo os sorbatos e benzoatos, tradicionalmente utilizados como conservantes em alimentos, além dos parabenos (metilparabeno, etilparabeno e propilparabeno). Vale ressaltar que o propilparabeno foi recentemente banido como conservante em alimentos, enquanto que para os demais a legislação ainda permite o seu uso, porém, com maior restrição que os sorbatos e benzoatos. As propriedades físico-químicas e valores de ingestão diária aceitável dos conservantes são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Propriedades físico-químicas e valores de ingestão diária aceitável (IDA) para os conservantes em estudo.

Propriedades	Benzoato*	Sorbato*	Metilparabeno	Etilparabeno	Propilparabeno
Fórmula molecular	C ₇ H ₆ O ₂	C ₆ H ₈ O ₂	C ₈ H ₈ O ₃	C ₉ H ₁₀ O ₃	C ₁₀ H ₁₂ O ₃
Número CAS	65-85-0	110-44-1	99-76-3	120-47-8	94-13-3
Massa molar – g mol⁻¹	122,12	112,12	152,16	166,18	180,21
pK_a	4,21	4,76	8,17	8,22	8,35
Solubilidade em água – 25 °C – g L⁻¹	3,4	1,9	20	8,6	3,0
IDA – mg kg⁻¹	0–5 ^a	0-25 ^b	0-10	0-10	n.p.

* - na forma dos ácidos correspondentes

a – para o ácido benzoico e seus sais

b – para o ácido sórbico e seus sais

n.p. – não permitido para uso como conservante em alimentos

4.2. Instrumentação utilizada

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento dos métodos para determinação de conservantes em alimentos estão descritos abaixo:

- ✓ Agitador tipo vortex modelo Certomat® MV-B (B. Braun, Brasil);
- ✓ Balança Analítica de precisão modelo FA 2104N (Bioprecisa, Brasil);
- ✓ Bomba à vácuo modelo TE-058 (Tecnal, Brasil);
- ✓ Centrífuga de tubos microprocessada modelo Q222T (Quimis aparelhos científicos, Brasil);
- ✓ Cromatógrafo à líquido modelo Prominence equipado com: bomba modelo LC-20AD, forno modelo CTO-20A, detector UV-Vis SPD-20A, coluna cromatográfica modelo CLC-ODS de 25 cm, pré-coluna modelo G-ODS, injetor automático modelo SIL-20A e sistema de aquisição de dados através do software LabSolutions® (Shimadzu, Japão);
- ✓ Homogeneizador do tipo ultra turrax modelo Ultra 80 (Ultra Stirrer, Brasil);
- ✓ Micropipetadores automáticos com capacidade variável (100 – 1000 µL) (Labmate, Polônia);
- ✓ pHmetro modelo pH20pH21 com eletrodo de vidro combinado (Hanna, Brasil);
- ✓ Sistema de filtração em membrana (Phenomenex, Estados Unidos);
- ✓ Sistema de Purificação de água modelo Milli-Q Direct-Q UV3® (Millipore, Estados Unidos);
- ✓ Ultrassom modelo Q335D (Quimis aparelhos científicos, Brasil).

4.3. Reagentes, solventes e materiais

Todos os reagentes, solventes e materiais utilizados no desenvolvimento dos métodos para determinação de conservantes em alimentos estão descritos abaixo:

- ✓ Acetonitrila (CH_3CN) grau HPLC (J.T Baker, Estados Unidos);
- ✓ Acetato de amônio ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) 99% (Merck, Brasil);
- ✓ Ácido acético (CH_3COOH) glacial 96% (Merck, Brasil);
- ✓ Ácido fosfórico (H_3PO_4) 85% (Merck, Brasil);
- ✓ Água destilada;
- ✓ Água Ultrapura, obtida através de sistema de purificação Direct-Q UV3® Millipore (resistividade $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$);
- ✓ Cloreto de sódio (NaCl) P.A. (Merck, Brasil);
- ✓ Detergente Extran® neutro (Merck, Brasil);
- ✓ Dispenser Boeco 10 - 50 mL;
- ✓ Frascos de vidro (vial) com capacidade de 2,0 mL;
- ✓ Hidróxido de sódio (NaOH) 99% (Merck, Brasil);
- ✓ Membrana filtrante de nylon $0,45 \mu\text{m}$ de diâmetro de poro e 47 mm de diâmetro (Millipore, Brasil);
- ✓ Padrões analíticos de pureza superior a 99%: metilparabeno e propilparabeno foram adquiridos da Sigma Aldrich (Estados Unidos); etilparabeno foi adquirido da Chem Service (Estados Unidos); sorbato de potássio e ácido benzoico foram adquiridos da Dinâmica (Brasil).
- ✓ Sulfato de magnésio (MgSO_4) anidro (J.T. Baker, Estados Unidos);
- ✓ Tubos tipo Falcon de polipropileno, com tampas rosqueáveis, capacidade de 15 e 50 mL (Sarstedt, Alemanha);
- ✓ Vidrarias em geral, como balões volumétricos, pipetas volumétricas, béquer entre outras.

4.4. Processamento das amostras

As amostras avaliadas neste trabalho foram processadas conforme descrito abaixo:

- a) Amostras carbonatadas – porções de aproximadamente 50 mL foram degaseificadas até eliminação do gás carbônico antes de serem submetidas ao processo de extração;
- b) Amostras sólidas – porções de aproximadamente 50 g foram processadas com auxílio do homogeneizador do tipo ultra turrax antes de serem submetidas ao processo de extração;
- c) Demais amostras – todo o conteúdo da embalagem foi homogeneizado por agitação ou com auxílio de bastão de vidro antes de ser submetido ao processo de extração.

4.5. Preparo das soluções analíticas

As soluções estoque contendo 10000 mg L⁻¹ de cada conservante foram preparadas pela dissolução dos padrões sólidos em MeCN ou água ultrapura, de acordo com a solubilidade, considerando o grau de pureza. As soluções foram armazenadas em frasco âmbar e estocadas a -18 °C. A partir das soluções estoque de 10000 mg L⁻¹ foram preparadas soluções intermediárias de concentrações de 1000 mg L⁻¹ de cada composto em MeCN.

Para a padronização e validação dos métodos foi preparada uma solução trabalho contendo a mistura dos conservantes na concentração de 100 mg L⁻¹ de cada analito. As soluções trabalho da mistura dos conservantes foram armazenadas em freezer a -18 °C.

4.6. Padronização do sistema cromatográfico para determinação de conservantes em alimentos

Para padronização das condições cromatográficas foram injetados padrões dos conservantes individuais na concentração de 10 mg L⁻¹, observando o tempo de

retenção de cada analito. Os comprimentos de onda foram selecionados a partir de revisão bibliográfica, sendo confirmado experimentalmente.

A seleção dos solventes a serem utilizados como fase móvel foi realizada a partir de conhecimentos prévios e revisão de trabalhos na literatura. Foi selecionada a MeCN como solvente orgânico, após ser filtrada a vácuo através de membranas de nylon (0,45 μm), e água ultrapura (resistividade 18,2 $\text{M}\Omega\text{ cm}$). Modificações necessárias na fase aquosa foram avaliadas durante o desenvolvimento do método, buscando sempre trabalhar no modo isocrático de eluição. Dessa forma, foram avaliadas as seguintes composições de fase móvel:

- MeCN:água ultrapura – diferentes composições;
- MeCN:água ultrapura acidificada à pH 3 com H_3PO_4 (1:1) – diferentes composições;
- MeCN:tampão acetato pH 4,2 – diferentes composições.

Para determinar a melhor condição de separação cromatográfica, foi avaliada a resolução dos picos, pela Equação 1:

$$R_s = 2 \times \left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{b1} + W_{b2}} \right) \quad (1)$$

Onde:

R_s = resolução entre dois picos adjacentes;

t_{R1} e t_{R2} = tempo de retenção de dois picos adjacentes;

W_{b1} e W_{b2} = largura dos picos na base, em unidades de tempo.

Maiores valores de R_s indicam melhor separação entre os picos. Em resumo, valores maiores que 1,5 indicam que há 100% de separação para picos gaussianos (COLLINS *et al.*, 2006).

Todos os solventes foram desgaseificados em banho de ultrassom durante 30 minutos, à temperatura ambiente. Os experimentos foram realizados com a vazão da fase móvel em 1 mL min^{-1} .

4.7. Seleção das amostras para padronização e validação dos métodos

Uma vez que os métodos desenvolvidos seriam aplicados para determinação de conservantes em diferentes tipos de alimentos processados, buscou-se durante o desenvolvimento dos mesmos uma matriz representativa de diferentes alimentos, de forma a minimizar o número de experimentos. Assim, amostras de leite longa vida (UHT) integral foram obtidas no mercado local do município de Rio Grande, sendo sempre observado o prazo de validade das mesmas. Foi selecionado o leite integral devido a sua complexidade, rico em proteínas, vitaminas, gordura, carboidratos e sais minerais, além de ser isento dos conservantes selecionados. Foi utilizada uma única marca de leite para padronização dos métodos. Enquanto fechadas, as amostras de leite foram acondicionadas ao abrigo da luz e calor. Após abertas, as amostras foram mantidas refrigeradas a 4 °C, sendo utilizadas por no máximo dois dias. Essas amostras foram utilizadas para padronização e validação dos métodos QuEChERS e SILLME. Além disso, foram selecionadas amostras de refrigerante, ketchup, geleia de fruta, iogurte e picles, representando desde amostras líquidas até amostras sólidas e pastosas, como amostras representativas dos diferentes grupos avaliados para validação do método QuEChERS, conforme recomendado pelo guia SANTE de validação (SANTE, 2017).

4.8. Desenvolvimento de método para determinação de conservantes em alimentos processados empregando QuEChERS e HPLC-UV

Inicialmente, foi avaliado o uso do método QuEChERS desenvolvido no LACOM para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em amostras de leite (ARIAS *et al.*, 2018). A partir deste método foram realizadas as modificações necessárias de forma a obter melhor perfil cromatográfico e recuperações próximas de 100%.

4.8.1. Método QuEChERS proposto por Arias *et al.* (2018)

O método consiste das seguintes etapas: 10 g de amostra em um tubo de polipropileno de 50 mL; em seguida, adiciona-se 10 mL de MeCN como solvente extrator e 100 µL de CH₃COOH, seguido de 15 segundos de agitação manual e 1 minuto de agitação em vortex; adiciona-se 4 g de MgSO₄ anidro e repete-se a etapa de agitação; centrifuga-se por 5 minutos a 7000 rpm (7793 g). Uma alíquota de 2 mL do extrato é transferida para um tubo de polipropileno de 15 mL de capacidade, contendo 150 mg de MgSO₄ e 50 mg de quitosana, sendo agitado por 1 minuto em vortex e centrifugado a 7000 rpm (7793 g) por 5 minutos. Após, uma alíquota do sobrenadante é transferida para um frasco tipo *vial* e injetada no sistema cromatográfico.

4.8.2. Modificação do método QuEChERS proposto por Arias *et al.* (2018)

Foi avaliada a redução na massa de amostra e posterior diluição dos extratos, de forma a evitar a realização da etapa de limpeza. Assim, o método foi realizado através das seguintes etapas: 1 g de amostra em um tubo de polipropileno de 50 mL; em seguida, adiciona-se 10 mL de água ultrapura para homogeneizar as amostras, 10 mL de MeCN como solvente extrator e 100 µL de CH₃COOH, seguido de 15 segundos de agitação manual e 1 minuto de agitação em vortex; adiciona-se 4 g de MgSO₄ anidro e repete-se a etapa de agitação; centrifuga-se por 5 minutos a 7000 rpm (7793 g). Após, uma alíquota de 500 µL do sobrenadante é diluída a 1 mL com água ultrapura em um frasco tipo *vial* e injetada no sistema cromatográfico.

4.8.3. Influência do NaCl na recuperação dos conservantes

Para avaliar a influência da adição de NaCl na recuperação dos conservantes foi realizado procedimento conforme descrito no item 4.8.2, variando a massa de NaCl (0, 1 e 2 g) adicionada juntamente com 4 g de MgSO₄. As amostras foram fortificadas em triplicata na concentração de 10 mg kg⁻¹.

Além da avaliação das recuperações, foi avaliado o efeito matriz para cada um dos conservantes de acordo com a massa de NaCl utilizada, visto que há relação entre a massa de sal no método QuEChERS e a quantidade de coextrativos da matriz.

4.8.4. Avaliação do método QuEChERS frente a diferentes alimentos processados

O desenvolvimento do método foi realizado utilizando amostras de leite UHT integral, devido às características já mencionadas. Entretanto, o método desenvolvido seria aplicado a diferentes amostras de alimentos processados, com características diferentes do leite. Deste modo, é importante avaliar a exatidão e precisão do método quando diferentes amostras são empregadas para garantir a confiabilidade dos dados que serão gerados.

Para avaliar o método frente a diferentes amostras, foram selecionadas amostras isentas de conservantes, que fossem representativas das categorias de alimentos que seriam analisados posteriormente. Para tal, uma amostra de refrigerante, ketchup, iogurte, geleia de fruta e pickles foram selecionadas, devido a sua complexidade e disponibilidade de marcas sem a adição de conservantes (isentas). As amostras foram fortificadas em triplicata na concentração de 10 mg kg^{-1} e submetidas ao procedimento otimizado. Também foram realizados ensaios em branco para confirmar que as amostras eram isentas de conservantes. Foram avaliadas as recuperações, RSD e efeito matriz para cada um dos conservantes nas diferentes amostras.

4.8.5. Avaliação da massa de amostra

Uma vez que a solubilidade dos conservantes pode variar de amostras líquidas para amostras sólidas e pastosas, foi avaliada a massa de amostra empregada, uma vez que o uso de apenas 1 g de amostra no método QuEChERS poderia não estar representando uma alíquota homogênea da amostra. Para tal, amostras que continham conservantes em sua composição foram submetidas ao método QuEChERS proposto, empregando 1 e 5 g de amostra. As amostras selecionadas para este ensaio foram: adoçante artificial, refrigerante, ketchup,

requeijão e doce de fruta, representando tanto amostras líquidas quanto amostras pastosas. Todas as amostras continham ao menos um dos conservantes em estudo listado nos ingredientes. Os resultados em termos de concentração para cada um dos conservantes foram comparados.

4.8.6. Aplicabilidade do método proposto

Após a validação do método, o mesmo foi aplicado em amostras de alimentos processados comercializadas no município de Rio Grande, RS, Brasil, obtidas durante o período de maio a julho de 2018.

Pela pesquisa no mercado local, foram identificados alimentos processados que apresentavam na lista de ingredientes do rótulo ao menos um dos conservantes selecionados para estudo. Os alimentos foram categorizados, e, para cada tipo, foram adquiridas ao menos 3 marcas diferentes:

- Bebidas não alcoólicas: refrigerante (9), sucos de frutas (6), energético (3), isotônico (3);
- Laticínios: iogurte (3), queijo *petit suisse* (3), queijo ralado (3), margarina (3), bebida láctea (3), requeijão (3), doce de leite (3);
- Molhos e condimentos: ketchup (4), mostarda (3), maionese (3), molho *shoyu* (3);
- Adoçantes artificiais: adoçante de mesa líquido (5);
- Doces e geleias: doces de fruta (3), geleia de fruta (3);
- Conservas: azeitona (4);
- *Fast food*: hambúrguer (3), batata frita (3), bebida (3), sorvete (3).

A Tabela A1 apresenta a composição média dos diferentes alimentos avaliados neste trabalho, obtida através da Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TBCA, 2019), além da informação em relação aos conservantes presentes nas amostras, obtidas nos rótulos dos alimentos.

As amostras de *fast food* avaliadas neste trabalho foram adquiridas de três companhias globais presentes no município de Rio Grande. Foram selecionadas como amostras opções oferecidas no cardápio infantil, compostas de hambúrguer,

bebida (refrigerante e água de coco foram encontrados) e batatas fritas, além da opção tradicional de sorvete.

A quantificação de cada conservante foi realizada com as curvas de calibração, sendo a concentração de cada conservante nas amostras calculada através da Equação 2:

$$C_{amostra} = 2 \times \left(\frac{C_{solução} \times V_{extração}}{m_{amostra}} \right) \quad (2)$$

Onde:

$C_{amostra}$ = Concentração da amostra, em mg kg^{-1} ;

$C_{solução}$ = Concentração de cada conservante calculado pela curva analítica, em mg L^{-1} ;

$V_{extração}$ = Volume de MeCN empregado na extração pelo método QuEChERS, em L;

$m_{amostra}$ = Massa de amostra, em kg.

Por fim, o resultado é multiplicado por 2, uma vez que ao final da extração, a amostra é diluída por um fator de diluição de 2 vezes (500 μL de amostra + 500 μL de água ultrapura).

4.8.7. Estimativa da ingestão diária de conservantes

Os resultados obtidos na aplicabilidade do método QuEChERS proposto foram utilizados para realizar a estimativa da ingestão diária (EDI, do inglês *Estimate of Daily Intake*) de conservantes pelos alimentos processados analisados. Para tal avaliação, foram utilizados os dados mais recentes da Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF), realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) durante o período de 2008 a 2009 em todo o país (IBGE, 2011). Neste estudo, dados sobre o consumo de alimentos, expressos em g *per capita* por dia, foram reportados para diferentes categorias, como consumo médio nacional. O cálculo da EDI foi realizado conforme apresentado na Equação 3.

$$EDI = \frac{CM \times IDM}{60 \text{ kg}} \quad (3)$$

Onde

EDI = Estimativa da ingestão diária;

CM = Concentração média, determinada experimentalmente, em mg kg^{-1} ;

IDM = Ingestão diária média, em $\text{kg pessoa}^{-1} \text{ dia}^{-1}$;

O denominador de 60 kg foi utilizado como um representativo da massa corporal média de um adulto (TFOUNI e TOLEDO, 2002b). Os resultados obtidos a partir deste cálculo foram comparados com a IDA.

4.9. Desenvolvimento de método para determinação de conservantes em alimentos processados empregando SILLME e HPLC-UV

As condições iniciais do método empregando a SILLME foram baseadas no trabalho de Du e colaboradores, sendo avaliadas as modificações necessárias para obtenção de recuperações próximas a 100% perfil cromatográfico adequado para todos os conservantes (DU *et al.*, 2014).

4.9.1. Modificação do método proposto por Du *et al.* (2014)

Para o desenvolvimento do método empregando SILLME, foram realizadas modificações no método original, de forma a adequar os experimentos à necessidade deste trabalho. Assim, os experimentos foram realizados da seguinte forma: 0,5 g de amostra e 4,5 mL de água ultrapura foram adicionados em um tubo de polipropileno de 15 mL; em seguida, adiciona-se 1 mL de MeCN como solvente extrator e o tubo é agitado por 1 minuto em vortex; adiciona-se o MgSO_4 anidro e agita-se por 3 minutos; centrifuga-se por 5 minutos a 7000 rpm (7793 g); 500 μL do sobrenadante são diluídos a 1 mL com água ultrapura para posterior determinação cromatográfica.

4.9.2. Influência da massa de MgSO₄ na recuperação dos conservantes

Para avaliar a influência da massa de MgSO₄ no método SILLME, foi realizado procedimento conforme descrito no item 4.9.1. Foram selecionados 1,5, 2,0 e 2,5 g de MgSO₄. Foi utilizada água ultrapura, sem modificação no seu pH, para solubilizar as amostras. As amostras foram fortificadas em triplicata na concentração de 10 mg kg⁻¹.

4.9.3. Influência do pH na recuperação dos conservantes

Para avaliar a influência do pH no método SILLME, foi realizado procedimento conforme descrito no item 4.9.1, sendo fixada a massa de MgSO₄ e variado o pH do meio. Foi avaliado o pH da água ultrapura adicionada nos valores de 2, 3, 4, 5 e 6, ajustado com soluções de H₃PO₄ (1:1, v/v) e NaOH 0,1 M, além de avaliar a adição de solução de ácido acético 1% e do tampão acetato pH 4,2. As amostras foram fortificadas em triplicata na concentração de 10 mg kg⁻¹.

4.9.4. Influência da adição de NaCl na recuperação dos conservantes

Para avaliar a influência da adição de NaCl no método SILLME, foi realizado procedimento conforme descrito no item 4.9.1, mantendo fixa a massa de MgSO₄ e o pH do meio, variando apenas a massa de NaCl adicionada. Foi avaliada a adição de 0,5 g e 1 g de NaCl, além do experimento sem a adição deste sal. As amostras foram fortificadas em triplicata na concentração de 10 mg kg⁻¹.

4.9.5. Avaliação do método SILLME frente a diferentes alimentos processados

Da mesma forma que foi avaliado para o método QuEChERS, amostras de refrigerante, ketchup, iogurte, geleia de fruta e pickles foram selecionadas, devido a sua complexidade e disponibilidade de marcas sem a adição de conservantes. As amostras foram fortificadas em triplicata na concentração de 10 mg kg⁻¹ e submetidas ao procedimento otimizado. Também foram realizados ensaios em

branco para confirmar que as amostras eram isentas de conservantes. Foram avaliadas as recuperações, RSD e efeito matriz para cada um dos conservantes nas diferentes amostras.

4.10. Validação dos métodos

Cada um dos métodos propostos foi validado seguindo parâmetros propostos pelo guia do INMETRO, que são: limite de detecção (LD); limite de quantificação (LQ); curvas analíticas (calibração externa no solvente e superposição na matriz); faixa linear; exatidão (através de ensaio de recuperação), precisão (repetitividade e precisão intermediária) e seletividade (INMETRO, 2018). Além desses parâmetros, também foi avaliada a incerteza das medições e o efeito matriz, através da comparação das áreas dos padrões e das inclinações das curvas analíticas preparadas na fase móvel e no extrato (SANTE, 2017).

4.10.1. Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção instrumental (LD_i) e de quantificação instrumental (LQ_i) foram estimados pela relação sinal/ruído (s/n) calculada com auxílio do *software* LabSolutions®, sendo estabelecido como LD_i as concentrações na qual a relação $s/n \geq 3$ e como LQ_i as concentrações na qual a relação $s/n \geq 10$. Os limites instrumentais foram obtidos pela padronização externa no solvente, através do preparo de soluções analíticas com diferentes concentrações na fase móvel.

Os limites de detecção do método (LD_m) e de quantificação do método (LQ_m) foram obtidos pela relação entre os limites instrumentais com os fatores de diluição dos métodos QuEChERS e SILLME. Foram buscados sempre valores de LQ_m que fossem iguais ou inferiores aos níveis máximos permitidos pelas legislações para cada um dos analitos nos diferentes métodos propostos.

4.10.2. Curva analítica e linearidade

A faixa linear instrumental foi avaliada utilizando calibração externa na fase móvel, enquanto a faixa linear do método foi avaliada pela construção da curva por superposição da matriz.

As curvas analíticas foram preparadas, em triplicata, em pelo menos sete níveis de concentração para cada conservante. Foram preparadas soluções trabalho contendo a mistura dos analitos, e através de diluições sucessivas destas soluções, foram construídas as curvas analíticas (na fase móvel e no extrato da matriz).

Os dados de regressão linear foram obtidos com auxílio do *software* LabSolutions® Shimadzu, além de outros *softwares* apropriados.

A linearidade do método foi obtida pela equação da regressão linear, sendo verificada a presença de dados discrepantes para cada nível de concentração pelo teste de Huber (VALENTE *et al.*, 2006). Para rejeitar dados anômalos com base na curva de linearidade usando o teste de Huber, é necessário estabelecer um valor central e os respectivos intervalos de confiança, que definem quais dados são aceitáveis, isto é, que pertencem ao intervalo de confiança. Inicialmente é realizada a divisão das áreas (A) pelas respectivas concentrações (C), obtendo os valores das razões A/C. O valor central é obtido pela mediana das razões A/C. Após, é obtida a mediana das diferenças absolutas entre as razões A/C e a mediana, obtendo o valor de Med.

Os limites de confiança superior (LCS) e inferior (LCI) são então obtidos com a fórmula $LCS = LCI = \text{Mediana} \pm k \times \text{Med}$, onde k é um fator que pode variar de 2 a 8. Quanto menor o valor de k maior é a rigidez com que os dados são desprezados. Neste trabalho foi utilizado valor de k = 2 para garantir que os valores utilizados para a construção da curva analítica estivessem dentro da faixa de linearidade, sendo removidos os valores discrepantes (fora dos intervalos de confiança LCS e LCI estabelecidos).

4.10.3. Exatidão

Foram realizados ensaios de recuperação para avaliar a exatidão dos métodos propostos. Para cada um dos métodos, buscou-se realizar ensaios de exatidão em níveis menores.

A exatidão foi avaliada fortificando as amostras em três níveis: baixo, médio e alto, para cada analito, cada nível avaliado em triplicata. Após a fortificação, as amostras foram agitadas em vortex por 1 minuto, sendo mantidas em repouso por 30 minutos. As amostras foram submetidas aos procedimentos de preparo de amostra otimizados.

A exatidão foi avaliada em termos de recuperação, conforme a Equação 4:

$$R(\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad (4)$$

Onde:

C_1 = Média das áreas da amostra fortificada antes da extração (pré-fortificação);

C_2 = Média das áreas da amostra não fortificada (branco);

C_3 = Média das áreas da amostra fortificada depois da extração (pós-fortificação).

4.10.4. Precisão

A precisão dos métodos, expressa pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD, do inglês *Relative Standard Deviation*) foi avaliada em função da repetibilidade (RSD_r) e da precisão intermediária (RSD_{pi}). Para a repetibilidade, as amostras foram fortificadas em diferentes níveis em triplicada, sendo submetidas ao procedimento de extração pelo método selecionado, injetadas no mesmo dia, pelo mesmo analista e nas mesmas condições cromatográficas. A partir dos valores das determinações realizadas ($n = 3$), foi calculado o RSD. A precisão intermediária foi avaliada da mesma forma, porém em dias diferentes. Para os cálculos de RSD foi utilizada a Equação 5:

$$RSD (\%) = \frac{s}{X_m} \times 100 \quad (5)$$

Onde:

s = Estimativa do desvio padrão absoluto;

X_m = Média de uma série de medidas

4.10.5. Incerteza das medições

A incerteza associada com a etapa de quantificação foi estimada a partir da seguinte sequência de equações (ELISSON e WILLIAMS, 2012; MARTINS *et al.*, 2016). Inicialmente, obtém-se a incerteza (u) para cada nível de fortificação, conforme descrito na Equação 6.

$$U_{(x)} = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (6)$$

Onde:

$U_{(x)}$ = incerteza associada ao nível de fortificação x;

s = estimativa do desvio padrão absoluto;

n = número de replicatas.

Após obter-se a incerteza (U) para cada um dos níveis de fortificação, é obtida a incerteza combinada dos três níveis de fortificação avaliados, conforme descrito na Equação 7.

$$U_{(c)} = \sqrt{(U_1^2 + U_2^2 + U_3^2)} \quad (7)$$

Onde:

$U_{(c)}$ = incerteza combinada dos três níveis de fortificação avaliados;

$U_{(1,2,3)}$ = incerteza de cada nível de fortificação.

A incerteza relacionada com a veracidade do método é calculada conforme descrito na Equação 8.

$$U_{(t)} = 100 - X_m \quad (8)$$

Onde:

$U_{(t)}$ = veracidade do método;

X_m = média das recuperações nos três níveis avaliados.

A partir dos dados da incerteza combinada dos três níveis de fortificação $U_{(c)}$ e da veracidade do método $U_{(t)}$ é obtida a incerteza combinada $U_{(c,t)}$, conforme descrito na equação 9.

$$U_{(c,t)} = \sqrt{U_{(c)}^2 + U_{(t)}^2} \quad (9)$$

Finalmente, a incerteza combinada é multiplicada por um fator de 2, obtendo a incerteza da medição para cada analito considerando, conforme Equação 10.

$$U = 2U_{(c,t)} \quad (10)$$

4.10.6. Efeito matriz

A avaliação do efeito matriz foi realizada de duas maneiras. Inicialmente, comparando as áreas obtidas das soluções analíticas preparadas no solvente e no extrato, conforme descrito na Equação 11 (MATUSZEWSKI *et al.*, 2003). Essa abordagem empregando comparação das áreas permite uma rápida avaliação do efeito matriz.

$$EM (\%) = \frac{a_1 - a_2}{a_2} \times 100 \quad (11)$$

Onde:

a_1 = Média das áreas obtidas pela injeção de soluções analíticas preparadas no extrato da matriz;

a_2 = Média das áreas obtidas pela injeção de soluções analíticas preparadas na fase móvel.

Após otimização do método, a avaliação do efeito matriz foi realizada por meio de comparações dos coeficientes angulares das curvas analíticas preparadas no solvente e no extrato (SANTE, 2017), conforme a Equação 12 (ECONOMOU *et al.*, 2009):

$$EM (\%) = \left(\frac{a_m}{a_s} - 1 \right) \times 100 \quad (12)$$

Onde:

a_m = Coeficiente angular da curva analítica preparada no extrato da matriz;

a_s = Coeficiente angular da curva analítica preparada na fase móvel.

Valores de efeito matriz entre $\pm 20\%$ são considerados baixos; valores entre $\pm 50\%$ são considerados médios; e valores fora da faixa de $\pm 50\%$ são considerados valores elevados de efeito matriz (ECONOMOU *et al.*, 2009).

4.10.7. Seletividade

A seletividade mede o grau em que o método pode quantificar o(s) analito(s) na presença de outros analitos, matrizes ou de qualquer interferente. Um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é chamado seletivo (INMETRO, 2018).

Neste trabalho, a avaliação da seletividade foi realizada através da comparação de cromatogramas de amostras branco e fortificadas com os conservantes na concentração de 10 mg kg^{-1} , submetidas aos dois procedimentos de extração padronizados.

4.11. Comparação entre os métodos QuEChERS e SILLME

Após a otimização e validação dos métodos empregando QuEChERS e SILLME, amostras de adoçante, ketchup, refrigerante, iogurte, requeijão, doce de fruta e suco de fruta foram submetidas aos dois procedimentos. As concentrações obtidas para cada conservante em cada amostra pelos dois métodos foram comparadas estatisticamente e a concordância entre os resultados foi avaliada.

4.12. Controle de qualidade nas determinações

Para assegurar a qualidade dos resultados, alguns critérios foram aplicados durante a realização das determinações. Foram realizadas diariamente determinações em “branco” das amostras e das vidrarias, antes das análises, para verificar e eliminar resultados falsos positivos por contaminação no processo de extração, instrumento, materiais ou reagentes utilizados durante todo o procedimento. Também foram realizadas injeções de soluções da mistura dos padrões na concentração de 10 mg L⁻¹ no HPLC-UV preparadas diariamente para verificar a sensibilidade e linearidade na faixa de trabalho das concentrações. Assim, os erros de quantificação causados por efeitos de matriz, além de possíveis flutuações instrumentais podem ser evitados.

4.13. Limpeza das vidrarias

Antes de serem utilizados, os materiais empregados neste estudo foram submetidos a um processo de limpeza, composto das seguintes etapas: lavagem exaustiva com água da torneira, seguido de enxágue com água destilada. Em seguida, os materiais foram mergulhados em detergente neutro 5% por 24 horas, seguido novamente de lavagem exaustiva com água da torneira e água destilada, além de serem rinsados com acetona. Posteriormente foram secos em estufa a 50 °C, com exceção da vidraria volumétrica, e armazenada em ambiente limpo e fechado.

4.14. Tratamento estatístico dos dados

Para avaliação dos resultados de recuperação durante a otimização dos métodos, foram realizadas análises de variância (ANOVA), com teste de post-hoc de Tukey realizado com o auxílio do *software* Statistica, versão 5.0 - Copyright © 1984-2007 Statsoft Inc.

5.RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Desenvolvimento de método para determinação de conservantes em alimentos processados empregando QuEChERS e HPLC-UV

5.1.1. Padronização do sistema de determinação por HPLC-UV

Inicialmente, foi realizada a avaliação das melhores condições de separação para determinação dos conservantes selecionados. Uma vez que os métodos de preparo de amostra empregando QuEChERS e SILLME utilizam MeCN como solvente, esse foi selecionado como fase móvel orgânica, aumentando a compatibilidade dos extratos. Adicionalmente, foram realizados testes com água ultrapura e modificadores, tentando trabalhar com a composição mais simples de fase móvel. A Tabela 6 apresenta as diferentes proporções de fase móvel testadas e os respectivos tempos de retenção dos analitos e a resolução entre os picos.

Dentre as composições apresentadas na Tabela 6, a que forneceu melhor separação cromatográfica foi a mistura MeCN:tampão acetato pH 4,2 (40:60, v/v), com resolução entre os picos acima de 1,5 para todos os pares de picos adjacentes. Devido ao fato dos conservantes benzoato e sorbato, determinados na forma dos ácidos correspondentes, apresentarem valores de pKa baixos (4,21 e 4,76, respectivamente), torna-se necessária a acidificação da fase móvel, para favorecer a interação com a fase estacionária. Entretanto, apenas a acidificação a pH 3 não foi suficiente para melhorar a resolução entre os picos, resolvendo apenas o problema de alargamento. Desta forma, após revisão na literatura, optou-se por utilizar o tamponamento da fase móvel (TFOUNI e TOLEDO, 2002a; KAMANKESH *et al.*, 2013; DING *et al.*, 2015).

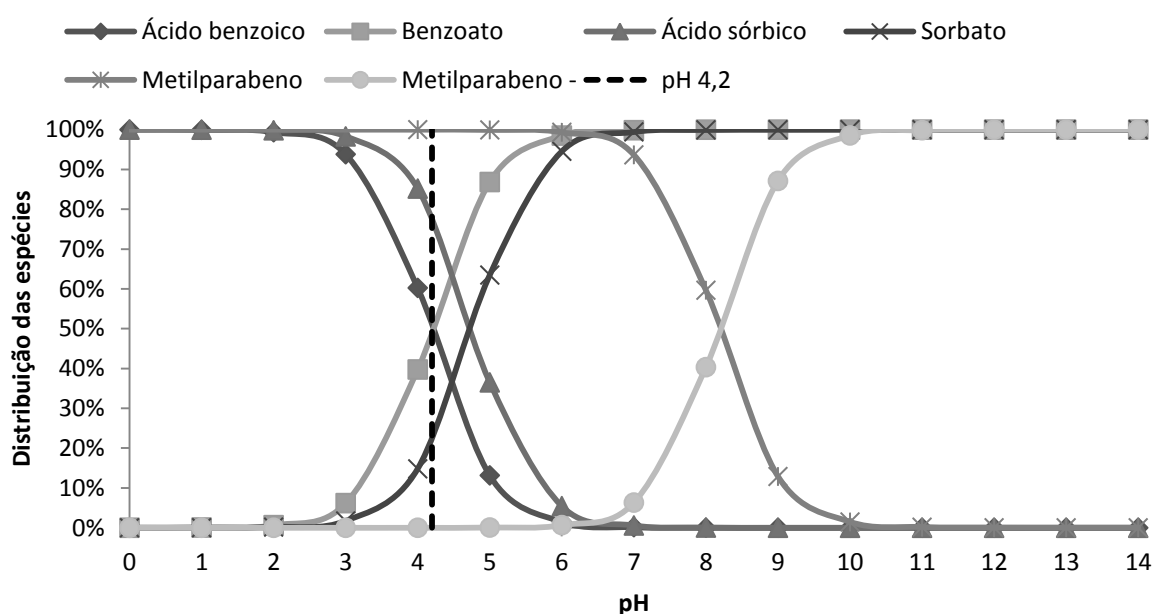
Tabela 6. Composições de fase móvel testadas na otimização da separação dos conservantes por HPLC-UV e as influências no tempo de retenção

Proporção dos solventes (%)				Tempo de retenção (minutos) e Resolução - R_s								Observações	
A	B	C	D	Benz.	Sorb.	R_s Benz-Sorb	MePB	R_s Sorb-MePB	EtPB	R_s MePB-EtPB	PpPB		R_s EtPB-PpPB
55	45			3,474	3,634	0,6	3,879	1,0	4,527	2,7	5,594	4,0	Co-eluição entre benzoato e sorbato. Picos com alargamento frontal
50	50			3,634	3,859	0,6	4,260	1,5	5,189	3,4	6,799	5,3	
45	55			3,744	4,065	0,7	4,696	2,0	6,004	4,3	8,369	6,7	
45		55		4,544	4,525	0,1	4,702	0,6	5,995	4,1	8,358	6,5	Bom formato dos picos. Co-eluição entre benzoato e sorbato.
40		60		5,169	5,152	0,1	5,391	0,7	7,381	5,4	11,281	8,7	
30		70		7,430	7,429	0,0	7,915	1,0	> 12	n.d	> 20	n.d	Tempo de análise aumenta diminuindo a força da fase móvel
20		80		14,380	14,461	0,1	15,868	1,7	> 20	n.d	> 20	n.d	
20			80	9,464	11,892	2,8	15,738	4,6	> 20	n.d	> 20	n.d	Boa resolução. Tempo de análise longo.
30			70	5,576	6,490	3,3	7,904	4,8	12,994	13,8	24,350	19,2	
40			60	4,248	4,713	2,1	5,437	3,2	7,452	7,9	11,318	12,0	Boa resolução. Tempo de análise reduzido pelo aumento da força da fase móvel.

A – MeCN, B – Água ultrapura, C – Água ultrapura pH 3,0, D – Tampão acetato pH 4,2, Benz – benzoato, Sorb – Sorbato, MePB – Metilparabeno, EtPB – Etilparabeno, PpPB – Propilparabeno, n.d – não determinado

Quando se faz a separação de compostos ácidos ou básicos em cromatografia líquida, o controle adequado do pH é de extrema importância. É muito comum o uso de soluções acidificadas, entretanto, em algumas situações, é necessário recorrer ao uso de soluções tampão (NETO, 2010), como é o caso neste trabalho. Uma vez que o pKa dos conservantes benzoato e sorbato são baixos (Tabela 5), pode ser observado pelo gráfico de espécies na Figura 8 que estes conservantes tendem a se dissociar em valores de pH acima de 3,0. Quando é utilizado tampão acetato pH 4,2, aproximadamente 50% das moléculas de ácido benzoico estão na forma dissociada, enquanto que apenas 20% das moléculas de ácido sórbico estão na forma dissociada. Essa diferença entre as moléculas na forma molecular e ionizada altera também a polaridade das mesmas, modificando a interação com a fase estacionária, conseqüentemente, separando as mesmas. Uma vez que a forma mais polar interage menos com a coluna de C18, o ácido benzoico (benzoato) elui primeiro, seguido do ácido sórbico (sorbato).

Figura 8. Gráfico de espécies em função do pH para os conservantes benzoato, sorbato e metilparabeno



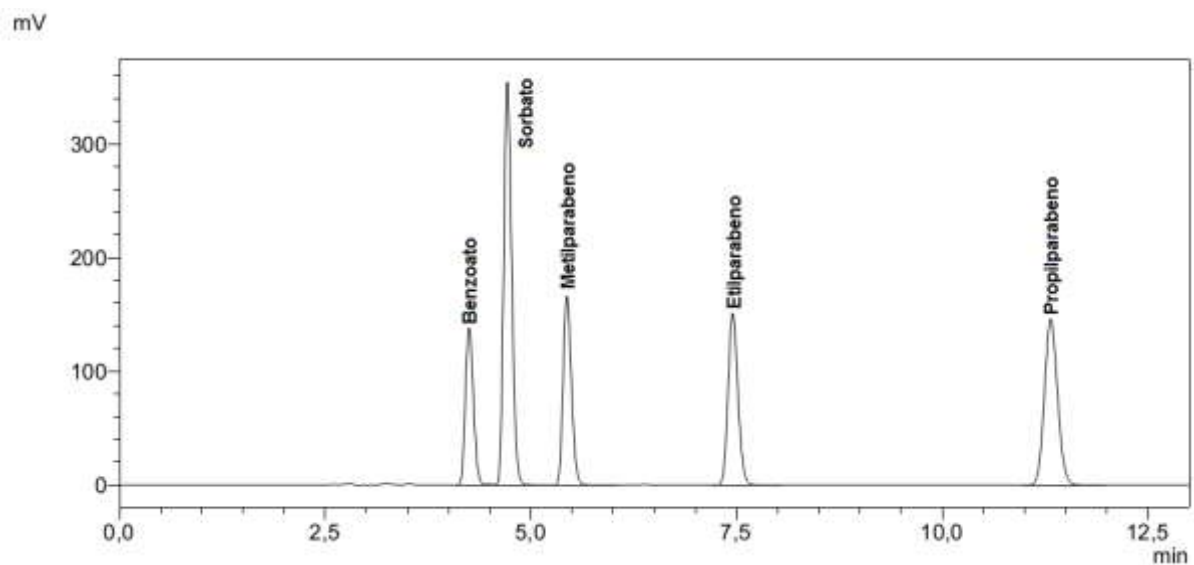
Desta forma, as melhores condições cromatográficas obtidas para a separação e quantificação dos conservantes por HPLC-UV são apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7. Condições cromatográficas padronizadas para o sistema HPLC-UV na determinação de conservantes

Coluna analítica	Shimadzu Shim-pack CLC (M) series C18 5 μ m 100 Å (250 x 4,6 mm d.i.)
Fase móvel	MeCN:tampão acetato pH 4,2 (40:60)
Vazão da fase móvel	1,0 mL min ⁻¹
Volume de injeção	20 μ L
Detector	UV
Comprimento de onda	230 e 254 nm
Tempo de análise	13 minutos

Nestas condições, o perfil cromatográfico dos conservantes em estudo pode ser observado na Figura 9, de uma solução padrão contendo a mistura dos compostos na concentração de 10 mg L⁻¹. Uma vez que foi obtida separação adequada entre os conservantes benzoato e sorbato, foi possível alterar o comprimento de onda para 230 nm para determinação do benzoato entre 4,0 e 4,5 minutos, sendo em seguida alterado para 254 nm para a determinação dos demais conservantes.

Figura 9. Cromatograma obtido por HPLC-UV nas condições padronizadas a partir de uma solução padrão 10 mg L⁻¹ dos conservantes em estudo



Com as condições de separação definidas, foi possível realizar a padronização do preparo de amostras empregando QuEChERS e SILLME.

5.1.2. Padronização do método QuEChERS de preparo de amostras

5.1.2.1. Avaliação do método Arias *et al.* 2018

Inicialmente, foi aplicado o método QuEChERS desenvolvido em nosso laboratório conforme procedimento descrito no item 4.8.1 (ARIAS *et al.*, 2018). Este método foi desenvolvido para a extração de resíduos de medicamentos veterinários em amostras de leite de diferentes tipos com determinação por LC-MS/MS. Entretanto, quando foi aplicado diretamente na determinação de conservantes não apresentou resultados satisfatórios, principalmente no que diz respeito à qualidade dos cromatogramas gerados.

Uma vez que a técnica de LC-MS/MS é mais seletiva que a HPLC-UV, era esperado que os cromatogramas obtidos pela segunda fossem mais afetados pela presença da matriz. Adicionalmente, uma vez que a concentração dos conservantes nas amostras normalmente estaria na faixa de 100 a 1000 mg kg⁻¹, foi necessário avaliar uma estratégia para reduzir a carga da matriz nos extratos finais.

Dessa forma, foi realizada a modificação do método conforme descrito no item 4.8.2. Para tal, a massa de amostra foi reduzida de 10 para 1 g; foi realizada adição de 10 mL de água logo após a pesagem das amostras, para homogeneizar as mesmas (*slurry*); e, ao final, a etapa de limpeza originalmente realizada foi descartada, enquanto que o extrato obtido foi diluído (1:1) com água ultrapura. Essa etapa de diluição foi adicionada para aproximar o extrato da composição da fase móvel, contribuindo assim para a simetria dos picos nos cromatogramas. Foram obtidas recuperações entre 81 e 83%, com RSD entre 2,7 e 9,6%.

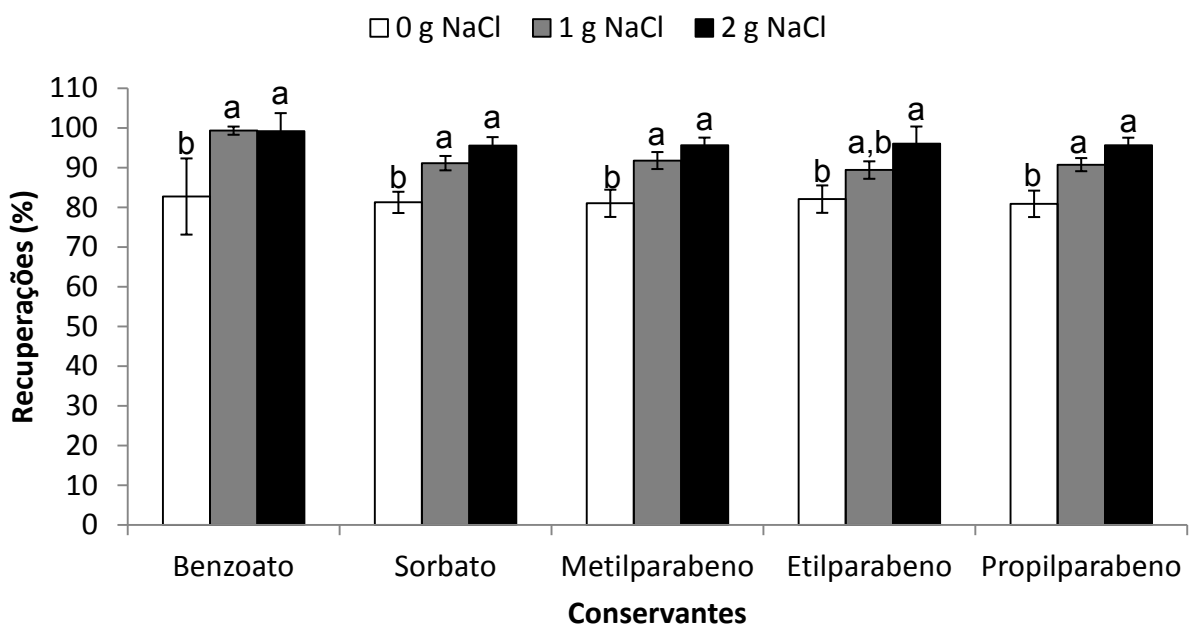
5.1.2.2. Influência da adição de NaCl na recuperação dos conservantes

A etapa de partição do método QuEChERS tradicionalmente é realizada pela adição de MgSO₄ e NaCl ou outros sais, com efeito tamponante. Esta etapa é de suma importância, pois favorece a migração dos compostos polares na fase aquosa para a fase extratora, pela diminuição da solubilidade, ocasionando em melhoras nas recuperações (PRESTES *et al.*, 2009). Além disso, o MgSO₄ também atua

reduzindo a quantidade de água na fase orgânica, sendo a sua hidratação uma reação exotérmica, liberando calor para a amostra, conseqüentemente, elevando a sua temperatura, o que favorece a extração de compostos menos polares (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

O uso de $MgSO_4$ no método QuEChERS é indispensável, visto que sem ele, não ocorre a separação entre as fases orgânica (MeCN) e aquosa, altamente miscíveis entre si. O uso de NaCl têm se mostrado opcional, visto que alguns trabalhos tem relatado boas recuperações (70-120%) mesmo sem o seu uso (RODRIGUES *et al.*, 2011; SAMPAIO *et al.*, 2013; ARIAS *et al.*, 2018). O NaCl é responsável pelo efeito *salting-out*, que é a precipitação de substâncias polares pela diminuição da solubilidade causada pela solubilização do sal. No caso, quando o NaCl é adicionado, espera-se favorecer a extração de analitos mais polares. Desta forma, foi avaliado o uso de NaCl no método conforme descrito no item 4.8.3. A Figura 10 apresenta o resumo dos resultados obtidos durante a avaliação do método QuEChERS.

Figura 10. Influência da massa de NaCl nas recuperações dos conservantes. Experimentos foram realizados utilizando 1 g de leite UHT fortificado a 10 mg kg^{-1} , 10 mL de MeCN e 4 g de $MgSO_4$. As barras de erro indicam RSD (%). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$)



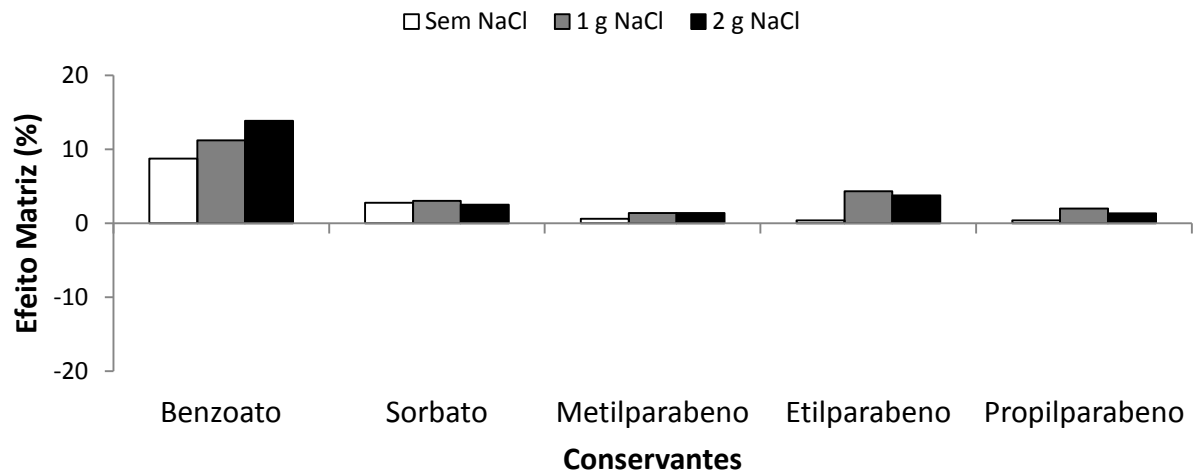
Conforme pode ser observado na Figura 10, houve uma tendência no aumento das recuperações com o aumento da massa de NaCl no método. Recuperações entre 89 e 99% ($RSD \leq 2,5\%$) foram obtidas quando foi utilizado 1 g de NaCl e entre 96 e 99% ($RSD \leq 4,5\%$) quando 2 g de NaCl foram utilizados. Embora valores ainda mais próximos de 100% foram obtidos quando 2 g de NaCl foram utilizados, não foi observado diferença significativa ($p < 0,05$) para 1 g.

Durante o desenvolvimento do método QuEChERS, originalmente proposto para determinação de agrotóxicos em frutas e vegetais, Anastassiades observou que há uma relação estequiométrica entre as quantidades dos sais utilizados na partição. O aumento da massa de NaCl no método ocasiona não somente o efeito *salting-out* dos analitos de interesse, mas também dos componentes da matriz (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). Assim, embora a adição de 2 g de NaCl também proporcionasse resultados satisfatórios em termos de recuperação, maior seria a possibilidade de interferentes da matriz no extrato final.

A Figura 11 apresenta os resultados para a avaliação do efeito matriz. Para tal, foi utilizada a Equação 11, que correlaciona as áreas dos padrões preparados na presença e na ausência da matriz. Baixos valores de efeito matriz foram obtidos, uma vez que foi assegurado previamente que a separação fosse seletiva, ou seja, que os analitos apresentassem tempo de retenção suficientemente diferente dos interferentes.

Assim, optou-se por trabalhar com 1 g de NaCl, visto que os resultados de recuperação foram significativamente diferentes quando o mesmo não foi usado, e de forma a economizar o reagente em relação ao uso de 2 g.

Figura 11. Avaliação do efeito matriz na determinação de conservantes frente a diferentes massas de NaCl no método QuEChERS



5.1.2.3. Influência da massa de amostra na concentração dos conservantes

Uma vez que a solubilidade dos conservantes nos alimentos pode ser diferente nas amostras líquidas, como as bebidas não alcoólicas, em comparação as amostras sólidas e pastosas, como requeijão, iogurte e doces, por exemplo, é importante avaliar a representatividade da amostra tomada para análise. Uma vez que é proposto pelo método o uso de apenas 1 g de amostra, é necessário garantir que esta quantidade de amostra seja representativa da amostra como um todo. Para tal, selecionaram-se amostras que continham ao menos um dos conservantes em estudo e submeteu-as ao método QuEChERS proposto, empregando 1 e 5 g de amostra. Os resultados obtidos para esta avaliação são apresentados na Tabela 8.

Pode ser observado que as concentrações obtidas para as amostras avaliadas foram similares, com a concordância entre os dados variando entre 92 a 99%. Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey com significância de 95%. Este resultado foi importante para confirmar que as amostras estavam sendo suficientemente homogeneizadas antes da extração e que 1 g de amostra era uma porção representativa, o que aumenta a confiabilidade dos resultados gerados a partir deste trabalho, além de permitir trabalhar com menor quantidade de amostra, simplificando o método e gerando menos resíduos.

Tabela 8. Comparação das concentrações \pm desvio padrão (mg kg^{-1}) de conservantes observadas quando diferentes massas de amostra são utilizadas.

Amostras	Benzoato		Sorbato		Metilparabeno	
	1 g	5 g	1 g	5 g	1 g	5 g
Adoçante artificial	451 \pm 18,8	417 \pm 10,2	n.d	n.d	448 \pm 11,4	479 \pm 20,5
Ketchup	729 \pm 15,0	725 \pm 3,1	663 \pm 7,8	671 \pm 30,2	n.d	n.d
Refrigerante	237 \pm 2,8	239 \pm 3,6	146 \pm 1,8	142 \pm 1,2	n.d	n.d
Requeijão	n.d	n.d	1111 \pm 79,8	1096 \pm 43,8	n.d	n.d
Doce de fruta	726 \pm 15,4	713 \pm 51,9	234 \pm 1,7	238 \pm 3,9	n.d	n.d

n.d – Não detectado

5.1.2.4. Método QuEChERS padronizado

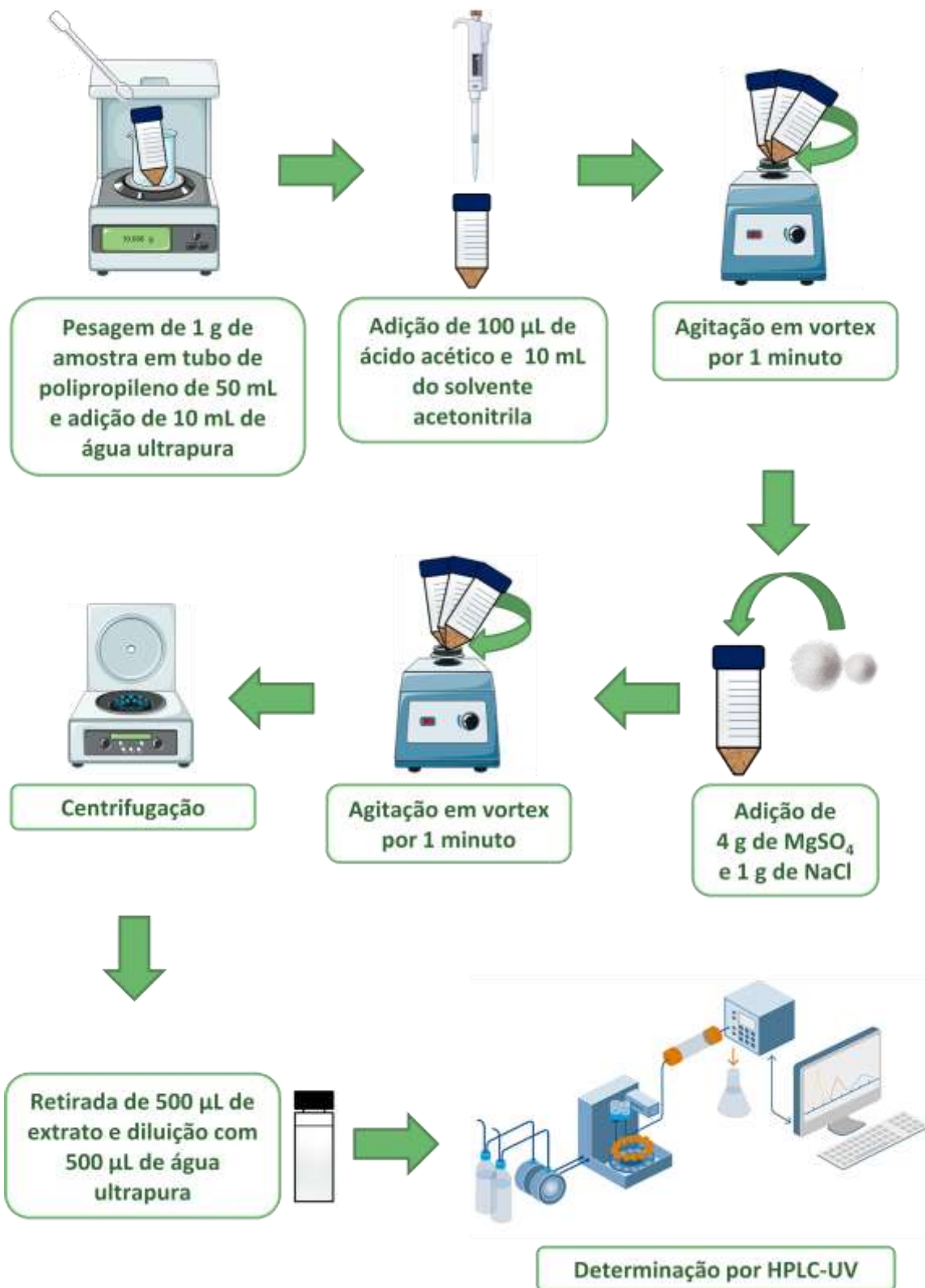
A partir dos testes realizados, foi possível avaliar as melhores condições para a extração e determinação de conservantes em alimentos. As etapas do procedimento padronizado estão descritas na Figura 12.

Uma vez que resultados satisfatórios foram obtidos pela modificação da massa de amostra e adição de NaCl, optou-se por não modificar as demais variáveis do método, como por exemplo, o uso de ácido acético, que em teoria, atua no deslocamento do equilíbrio dos analitos ácidos, como o benzoato e o sorbato.

O método consiste de uma etapa de acidificação da amostra com ácido acético, extração com MeCN, partição pela adição de $MgSO_4$ e NaCl, e diluição, para posterior determinação por HPLC-UV. O método se caracteriza por sua simplicidade de etapas, ideal para ser implementado em um laboratório de análise de rotina ou mesmo substituir os métodos tradicionalmente empregados.

O método padronizado foi submetido ao procedimento de validação, para garantir a confiabilidade dos resultados gerados.

Figura 12. Esquema do método QuEChERS padronizado para determinação de conservantes em alimentos



5.1.2.5. Avaliação do método QuEChERS frente a diferentes amostras

Uma vez que o método seria aplicado à determinação de conservantes em diferentes alimentos processados, foi realizada a avaliação do método frente a diferentes amostras isentas de conservantes. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 9.

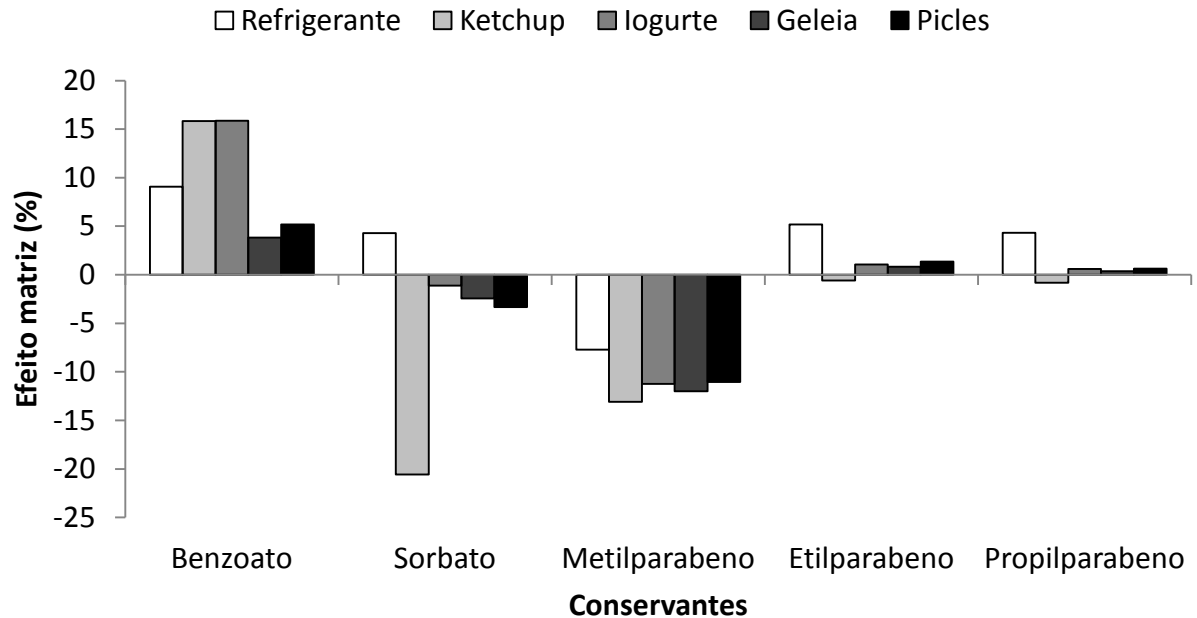
Como pode ser observado, foram obtidas recuperações entre 87 e 100%, com RSD menores que 8,5% para todos os conservantes em estudo nas amostras avaliadas. Mesmo as amostras apresentando características bem distintas, como, por exemplo, teor de água, açúcares, sais, pigmentos, gordura, entre outros constituintes, podemos observar que o método se comportou de maneira satisfatória, com recuperações dentro da faixa de 70 a 120%, considerada ideal quando se trabalha com determinações de resíduos e contaminantes empregando técnicas cromatográficas (SANTE, 2017). Ainda, seguindo as recomendações do Comitê Diretivo de Pesquisa em Ciência de Alimentos e Medicina Veterinária (*Foods And Veterinary Medicine Science and Research Steering Committee, FDA*), o critério de recuperações entre 80 e 110% com $RSD \leq 6\%$ foi atingido em 96% das avaliações. Esta avaliação é crucial, uma vez que o método seria aplicado na determinação de conservantes em diferentes matrizes.

Juntamente com a exatidão e a precisão, foi avaliado o efeito matriz, conforme descrito na Equação 11, pela comparação dos padrões preparados no extrato e na fase móvel. Conforme pode ser observado na Figura 13, o efeito matriz variou de - 21% a 16%, para os 5 conservantes nas 5 amostras avaliadas. Estes valores são considerados efeito matriz baixo (ECONOMOU *et al.*, 2009), ajudando na decisão de quantificar as diferentes amostras pelas curvas analíticas preparadas na fase móvel.

Tabela 9. Recuperações (R%) e desvio padrão relativo (RSD) para os conservantes em diferentes alimentos processados empregando o método QuEChERS de preparo de amostras. Experimentos foram realizados em triplicata na concentração de 10 mg kg^{-1} para cada conservante em cada amostra.

Amostras	Benzoato		Sorbato		Metilparabeno		Etilparabeno		Propilparabeno	
	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)
Refrigerante	89	1,7	88	0,5	87	0,2	89	0,5	89	0,2
Ketchup	93	3,1	93	2,8	93	3,0	94	2,5	95	2,4
logurte	99	0,5	94	0,8	92	0,7	93	0,5	94	0,6
Geleia de fruta	98	1,8	92	2,3	90	3,0	91	2,9	92	2,9
Picles	93	2,5	93	1,2	100	8,5	92	1,2	92	0,9

Figura 13. Avaliação do efeito matriz na determinação de conservantes frente a diferentes amostras no método QuEChERS



Selecionar matrizes representativas de um conjunto de diferentes alimentos é uma estratégia interessante no desenvolvimento de métodos de preparo de amostra para determinação de compostos orgânicos. A partir dessa abordagem, é possível garantir resultados confiáveis ao método sem a necessidade de avaliar a exatidão e a precisão do método em todas as matrizes das quais se pretende avaliar, economizando tempo e consumo de reagentes. Ao mesmo tempo, o método desenvolvido favorece a execução de experimentos empregando matrizes representativas, pois utiliza menor massa de amostra e adiciona 10 mL de água, diluindo todas as amostras por igual, tornando-as mais parecidas. Este fato explica as recuperações satisfatórias, baixos efeitos de matriz e a similaridade dos resultados mesmo quando diferentes matrizes são empregadas.

5.1.3. Validação do método empregando QuEChERS e HPLC-UV para determinação de conservantes em alimentos

Uma vez que foram obtidos resultados satisfatórios para exatidão e precisão para o método quando diferentes matrizes foram utilizadas, foi realizada a etapa de validação do método.

5.1.3.1. Limites de detecção e quantificação

Os valores de LD_i variaram entre 0,002 e 0,005 $mg L^{-1}$, enquanto que para o LQ_i os valores variaram entre 0,006 e 0,016 $mg L^{-1}$. Esses valores representam as menores concentrações que o instrumento pode determinar e quantificar, respectivamente, com precisão e exatidão aceitáveis. Para os LD_m e LQ_m , foi considerado todo o procedimento, envolvendo o método de preparo de amostra por QuEChERS. Um fator de diluição de 20 vezes é aplicado, uma vez que 1 g de amostra é extraído com 10 mL de acetonitrila, e, ao final da extração, 500 μL são diluídos a 1 mL com água ultrapura. A Tabela 10 apresenta os dados obtidos para os LD e LQ, tanto instrumental quanto do método.

Os valores de LD e LQ obtidos neste trabalho são comparáveis ou até melhores que os observados por outros trabalhos na literatura. Abedi e colaboradores determinaram benzoato e sorbato em derivados de leite empregando DLLME e GC-FID. LD_m de 0,150 $mg kg^{-1}$ e 0,140 $mg kg^{-1}$ e LQ_m de 0,500 $mg kg^{-1}$ e 0,473 $mg kg^{-1}$, foram obtidos, para sorbato e benzoato, respectivamente (ABEDI *et al.*, 2014). Ding e colaboradores obtiveram LD_m de 0,2 $mg L^{-1}$ e 0,1 $mg L^{-1}$ para benzoato e sorbato, respectivamente, na determinação em molho shoyu empregando LLE e HPLC-UV (DING *et al.*, 2015). Além disso, os valores observados para os LD_m e LQ_m são adequados para as determinações propostas, uma vez que são menores que as concentrações máximas permitidas de conservantes em alimentos.

Tabela 10. Limite de detecção instrumental (LD_i), limite de quantificação instrumental (LQ_i), limite de detecção do método (LD_m), limite de quantificação do método (LQ_m), faixa linear, coeficiente angular (*a*), intercepto (*b*), coeficiente de determinação (R²) para as curvas analíticas preparadas no solvente e no extrato e efeito matriz. Foi utilizado como matriz o leite UHT integral.

Conservantes	mg L ⁻¹		mg kg ⁻¹		Faixa de trabalho		Curvas analíticas						Efeito matriz
	LD _i	LQ _i	LD _m	LQ _m	mg L ⁻¹	mg kg ⁻¹	Solvente			Extrato			
							<i>a</i>	<i>b</i>	R ²	<i>a</i>	<i>b</i>	R ²	%
Benzoato	0,005	0,016	0,11	0,33	0,05 - 50	1 - 1000	95199,4	-935,983	0,99996	95542	5262,37	0,99996	0,36
Sorbato	0,002	0,006	0,04	0,13	0,05 - 50	1 - 1000	241954	-1840,13	0,99995	242477	-8345,7	0,99996	0,22
Metilparabeno	0,004	0,013	0,09	0,26	0,05 - 50	1 - 1000	119128	-2263,89	0,99996	119769	-7122,94	0,99996	0,54
Etilparabeno	0,004	0,012	0,08	0,24	0,05 - 50	1 - 1000	128057	-2757,64	0,99996	128748	-7780,36	0,99996	0,54
Propilparabeno	0,003	0,009	0,06	0,19	0,05 - 50	1 - 1000	164960	-1996,67	0,99995	166053	-9224,81	0,99996	0,66

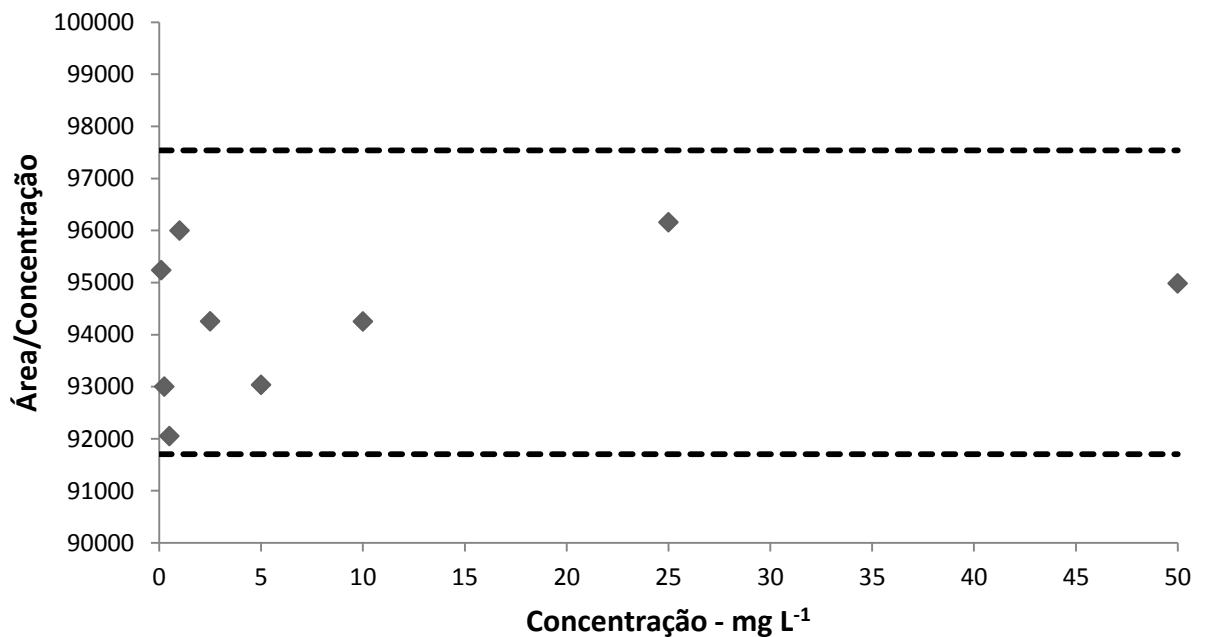
5.1.3.2. Curva analítica, linearidade e faixa de trabalho

A Tabela 10 apresenta, além dos valores de LD e LQ, os dados das curvas analíticas, preparadas na fase móvel e no extrato. Embora os valores de LQ_m obtidos fossem de até $0,33 \text{ mg kg}^{-1}$, optou-se por trabalhar com as curvas analíticas, para todos os conservantes, em concentrações maiores, a partir de 1 mg kg^{-1} . Esta escolha foi realizada uma vez que os conservantes estariam presentes nas amostras apenas em concentrações maiores que esta, e, até superiores a 1000 mg kg^{-1} , de acordo com o alimento analisado. Desta forma, foi selecionada a faixa entre 1 a 1000 mg kg^{-1} para todos os conservantes, de maneira a garantir que estaríamos trabalhando com curvas analíticas na faixa de concentração presente nas amostras. Para amostras com concentrações maiores que esta uma diluição poderia ser realizada.

A Figura 14 apresenta um exemplo da curva de linearidade obtida pelas áreas sobre a concentração (eixo y), pela concentração (eixo x), para o benzoato. Com a aplicação do teste de Huber, foi obtido um intervalo de confiança, representado pelas linhas tracejadas na figura. Os pontos situados dentro deste intervalo são pertencentes ao intervalo linear dinâmico, sendo utilizados para a construção da curva analítica. Os dados anômalos, fora da faixa, foram rejeitados.

A avaliação pelo teste de Huber foi realizada para todos os conservantes em estudo neste trabalho. Após a aplicação deste teste, foram obtidas as curvas analíticas no solvente e no extrato. Os resultados são apresentados na Tabela 10. As curvas analíticas preparadas no solvente e no extrato apresentaram coeficientes de correlação (r) maiores que 0,99 para todos os conservantes, estando dentro da faixa recomendada pela ANVISA ($r > 0,99$) (ANVISA, 2017).

Figura 14. Gráfico de linearidade para o conservante benzoato na curva analítica preparada na fase móvel



5.1.3.3. Exatidão, precisão e incerteza das medições

Para avaliação da exatidão do método foram realizados ensaios de recuperação em três níveis, nas concentrações de 1, 5 e 10 mg kg⁻¹, conforme procedimento otimizado descrito no item 5.1.2.4. A precisão do método foi avaliada em termos de repetibilidade (RSD), nos mesmos três níveis. Ambos os ensaios foram realizados em termos de repetibilidade e reprodutibilidade.

Para garantir a confiabilidade do método proposto e reduzir o número de experimentos necessários, a validação do método foi realizada empregando o uso de matrizes representativas, conforme descrito pelo guia SANTE. O mesmo sugere o uso de matrizes representativas para validar métodos multirresíduos e multimatrizes, selecionando uma amostra que seja representativa de um grupo maior de amostras. Por exemplo, o uso de uma amostra de iogurte como representativa de derivados lácteos (SANTE, 2017). Desta forma, foram utilizadas amostras isentas dos conservantes de leite UHT integral, refrigerante, ketchup, iogurte, geleia e pickles durante a validação. A Tabela 11 apresenta os dados de exatidão e precisão para a

amostra de leite UHT integral, enquanto para as demais matrizes os resultados estão disponíveis no Apêndice A (Tabelas A2-A6).

Em resumo, as recuperações variaram entre 77 e 109%, com RSD \leq 20%, para todos os conservantes em todas as seis amostras validadas, tanto na repetibilidade quanto na precisão intermediária. De acordo com a orientação para validação de métodos cromatográficos, valores de recuperação dentro da faixa entre 70 e 120%, com valores de RSD \leq 20%, são considerados satisfatórios (SANTE, 2017). Ainda, seguindo as recomendações do Comitê Diretivo de Pesquisa em Ciência de Alimentos e Medicina Veterinária (*Foods And Veterinary Medicine Science and Research Steering Committee, FDA*) em 99% das avaliações de exatidão e precisão no nível 1 mg kg⁻¹ e em 94% das avaliações no nível 10 mg kg⁻¹ os valores estão dentro da faixa de recuperação de 80 a 110% com RSD menores que 8 e 6%, respectivamente (FDA, 2015). Desta forma, os resultados obtidos são adequados para determinações de conservantes em análises de rotina.

A incerteza das medições associada com a quantificação foi avaliada para o método proposto, sendo os resultados apresentados também na Tabela 11 para a amostra de leite UHT integral, enquanto que para as demais matrizes os resultados estão no Apêndice A (Tabelas A2-A6). Para todas as matrizes e conservantes avaliados a incerteza variou entre 3,2 a 39,1%. De acordo com as diretrizes do SANTE, os resultados das determinações não precisam ser ajustados para recuperação quando a média estiver dentro da faixa de 80 a 120% e o critério de 50% de incerteza de medição expandida for cumprido (SANTE, 2017). Este resultado reflete a capacidade do método analítico em fornecer resultados confiáveis, uma vez que a incerteza observada encontra-se abaixo do valor de 50% estabelecido como adequado.

Tabela 11. Avaliação da exatidão, em termos de recuperação (R%), precisão, em termos de repetibilidade (RSD_r) e precisão intermediária (RSD_{pi}) e incerteza da medição (U %) do método QuEChERS. Experimentos foram realizados utilizando como amostra representativa o leite UHT integral, isenta de conservantes.

Conservante	Repetibilidade							Precisão intermediária						
	1 mg kg ⁻¹		5 mg kg ⁻¹		10 mg kg ⁻¹		U %	1 mg kg ⁻¹		5 mg kg ⁻¹		10 mg kg ⁻¹		U %
	R%	RSD _r	R%	RSD _r	R%	RSD _r		R%	RSD _r	R%	RSD _r	R%	RSD _r	
Benzoato	103	3,2	104	2,4	98	1,8	6,2	91	4,4	95	4,9	105	4,6	13,5
Sorbato	99	2,4	100	0,8	96	1,1	4,6	93	1,8	92	5,3	100	1,1	12,3
Metilparabeno	106	1,6	102	0,7	96	1,4	3,6	100	0,9	94	3,9	100	0,9	6,4
Etilparabeno	105	1,8	101	0,6	96	1,4	3,2	100	1,1	98	2,7	103	1,7	3,8
Propilparabeno	107	2,2	102	0,6	96	1,3	4,4	100	1,8	94	4,5	100	0,9	7,1

5.1.3.4. Efeito matriz

O efeito matriz foi avaliado para verificar se os padrões preparados na fase móvel seriam adequados para quantificar os conservantes em diferentes matrizes. Esta avaliação foi realizada pela comparação dos coeficientes angulares das curvas analíticas preparadas na fase móvel e no extrato do leite UHT integral, após procedimento de extração, conforme proposto na Equação 12. Os resultados são apresentados na Tabela 10.

Pode ser observado que valores de efeito matriz baixo ($\pm 20\%$) foram obtidos, o que significa que a matriz apresenta baixa influência na área dos analitos. Este fato pode ser explicado pela seletividade do método cromatográfico, não havendo a presença de outros picos no cromatograma no mesmo tempo de retenção dos analitos e, também, pela eficiência do método de preparo de amostra em isolar os analitos de interesse dos possíveis interferentes. Desta forma, pela avaliação do efeito matriz, foi possível comprovar que o preparo das curvas analíticas na fase móvel seria adequado para quantificar as diferentes amostras propostas neste trabalho.

5.1.3.5. Seletividade do método QuEChERS

A avaliação da seletividade foi realizada pela comparação dos cromatogramas de amostras que não continham os conservantes em sua composição (branco) com as amostras fortificadas, permitindo distinguir o sinal dos analitos dos possíveis interferentes da determinação. Uma vez que o detector UV utilizado neste trabalho não é o mais seletivo dos detectores, ou seja, no caso de coeluição, não é possível realizar a distinção entre os sinais, é importante garantir que os analitos estejam suficientemente separados dos interferentes.

Desta forma, são apresentados nas Figura 15, 16 e 17, cromatogramas representando a avaliação da seletividade do método QuEChERS padronizado para amostras de refrigerante, ketchup e picles, representando amostras líquidas, pastosas e sólidas, respectivamente. Pode ser observado nos cromatogramas das amostras branco que os analitos não apresentam nenhum sinal de interferentes no mesmo tempo de retenção, destacando assim, a seletividade do método proposto

para a determinação de conservantes. O mesmo perfil foi observado para as diferentes amostras avaliadas neste trabalho.

Figura 15. Cromatogramas para uma amostra de refrigerante (a) branco e (b) fortificada na concentração de 10 mg kg^{-1} , submetida ao QuEChERS padronizado

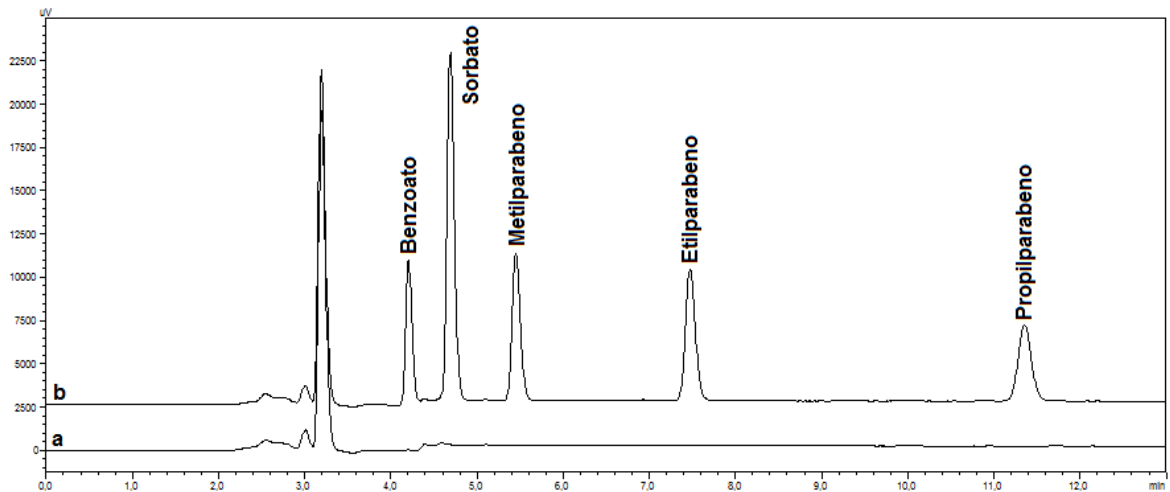


Figura 16. Cromatogramas para uma amostra de ketchup (a) branco e (b) fortificada na concentração de 10 mg kg^{-1} , submetida ao QuEChERS padronizado

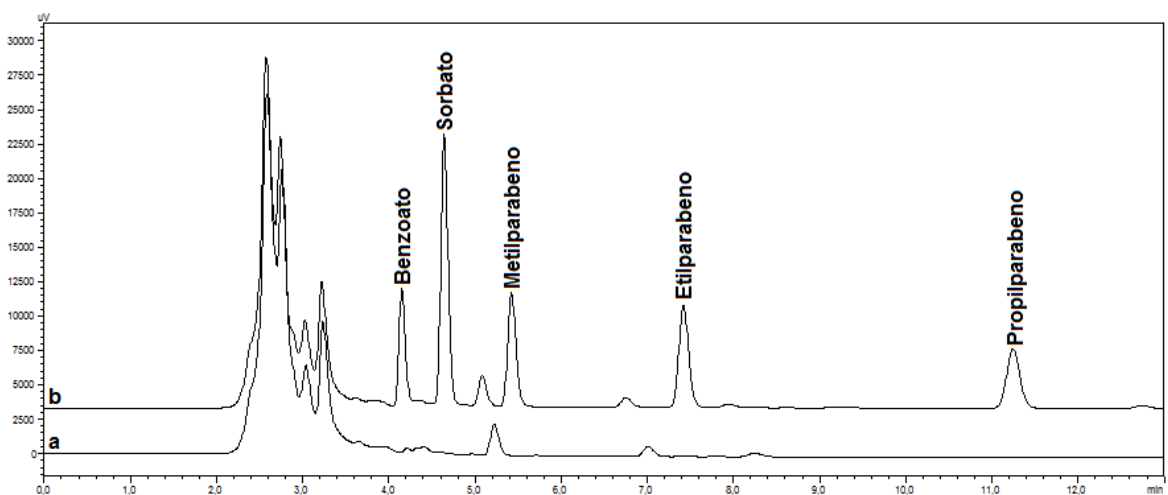
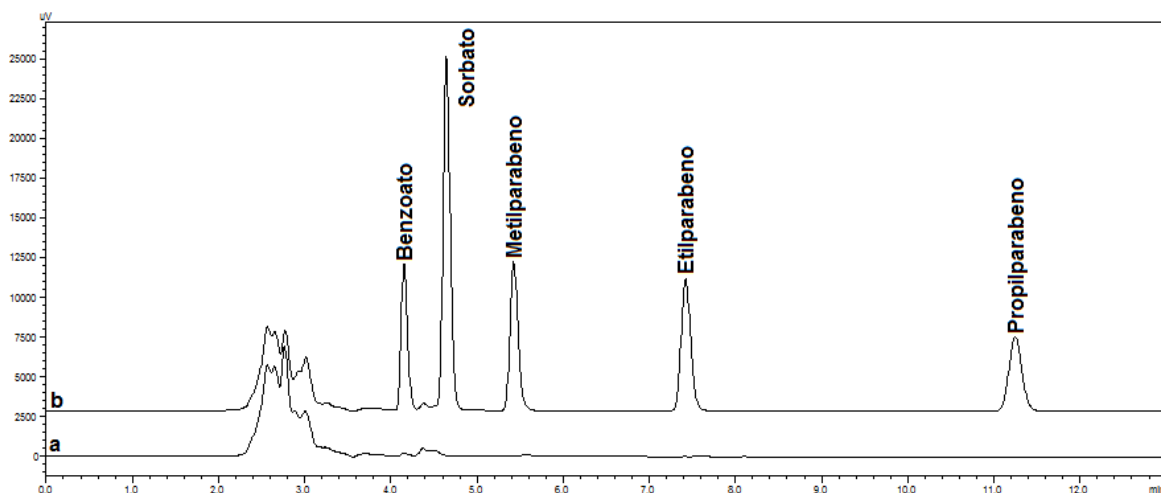


Figura 17. Cromatogramas para uma amostra de picles (a) branco e (b) fortificada na concentração de 10 mg kg^{-1} , submetida ao QuEChERS padronizado

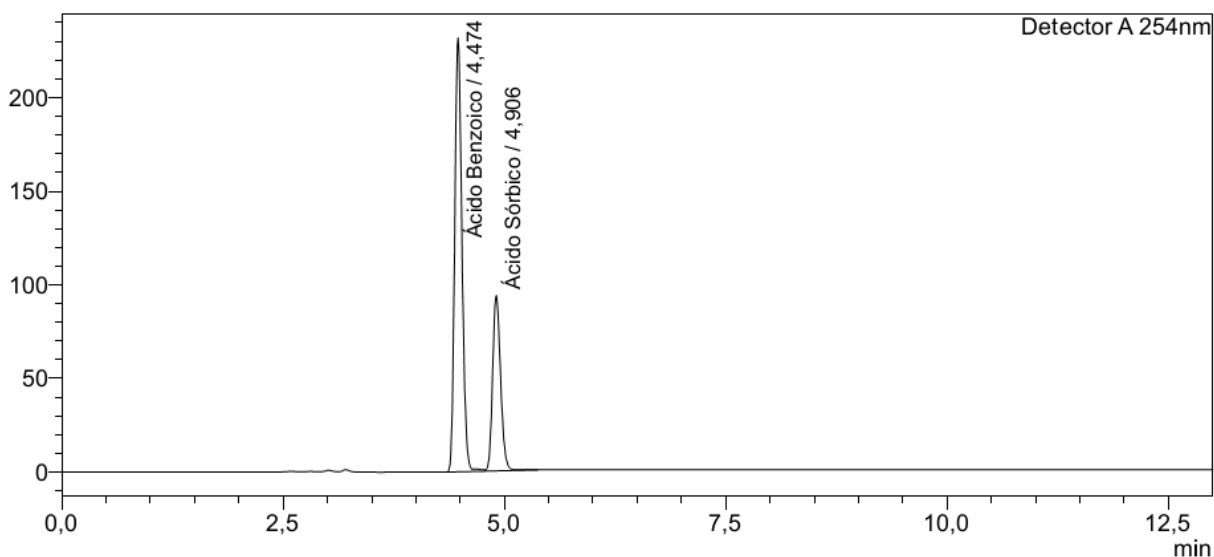


5.1.4. Aplicabilidade

Depois de validado, o método proposto foi aplicado na determinação de conservantes em 82 amostras de alimentos processados comercializados no município de Rio Grande, RS, nos meses de maio a agosto de 2018. É importante ressaltar que os conservantes foram determinados em todos os alimentos cujos rótulos mencionaram o seu uso, enquanto que nos rótulos de produtos que não mencionavam a presença destes conservantes estes não foram detectados.

De maneira geral, os sorbatos foram os principais conservantes determinados nos derivados de leite, enquanto que o benzoato foi o majoritário nas bebidas não alcoólicas, embora alguns alimentos utilizem ambos os conservantes, como alguns refrigerantes, conforme pode ser visto na Figura 18. O metilparabeno, que foi o único dos parabenos quantificado, constava apenas nos rótulos dos adoçantes artificiais, o que explica a baixa concentração e frequência nas amostras.

Figura 18. Cromatograma para uma amostra de refrigerante, positiva para os conservantes benzoato (260 mg kg^{-1}) e sorbato (46 mg kg^{-1}).



Quando comparado com os dados fornecidos de concentração máxima permitida de conservantes em alimentos, podemos observar que de maneira geral as amostras se enquadraram na legislação. Das 82 amostras analisadas apenas uma amostra de molho *shoyu* apresentou concentração de benzoato (2040 mg kg^{-1}) maior do que a permitida pela legislação (1000 mg kg^{-1}) para este tipo de alimento. Para o sorbato, uma amostra de queijo (3185 mg kg^{-1}), uma amostra de margarina (722 mg kg^{-1}) e uma amostra de maionese (912 mg kg^{-1}) apresentaram concentrações acima da permitida pela legislação (2000 , 500 e 800 mg kg^{-1} , respectivamente).

A Tabela 12 apresenta os resultados obtidos para a determinação de benzoato em alimentos processados, enquanto que na Figura 19 há um cromatograma para uma amostra de azeitona, positiva para o conservante benzoato. Pode ser observado que as concentrações variaram entre não detectado ($< \text{LOQ}$) até 2040 mg kg^{-1} , com $\text{RSD} \leq 6,5\%$. As amostras de molho *shoyu* e adoçante de mesa líquido foram as que apresentaram a maior média de concentração de benzoato.

Ding e colaboradores determinaram benzoato em amostras de molho *shoyu* comercializadas na China em concentrações que variaram de $238,7$ a $661,3 \text{ mg kg}^{-1}$ empregando LLE e HPLC-UV (DING *et al.*, 2015). Em outro trabalho dos mesmos autores, empregando DLLME e GC-MS, foi determinado benzoato em amostras de

molho *shoyu*, vinagre, refrigerante e suco de fruta em concentrações entre 71,6 e 681,3 mg kg⁻¹, sendo as maiores concentrações observadas também para molho *shoyu* (DING *et al.*, 2018). Javanmardi e colaboradores determinaram benzoato em 92,5% das amostras avaliadas de refrigerante, leite UHT, ketchup e pão comercializadas no Irã, em concentrações entre 3,5 e 1520 mg L⁻¹ (JAVANMARDI *et al.*, 2015). Tfouni e Toledo determinaram benzoato em concentrações de até 804 mg L⁻¹ em amostras de refrigerante, margarina e suco de fruta comercializados no Brasil (TFOUNI e TOLEDO, 2002a). Abedi e colaboradores determinaram benzoato em baixas concentrações em amostras de derivados de leite comercializados no Irã empregando DLLME e GC-FID (ABEDI *et al.*, 2014). Todos os dados obtidos neste trabalho estão consistentes com os dados disponíveis na literatura.

Figura 19. Cromatograma para uma amostra de azeitona, positiva para o conservante benzoato (858 mg kg⁻¹).

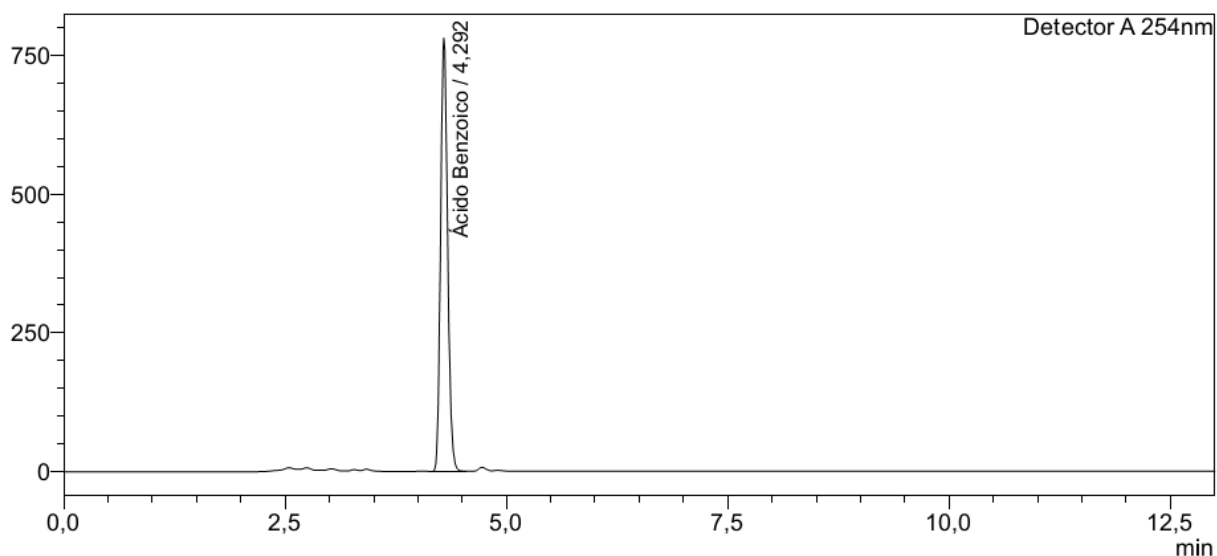


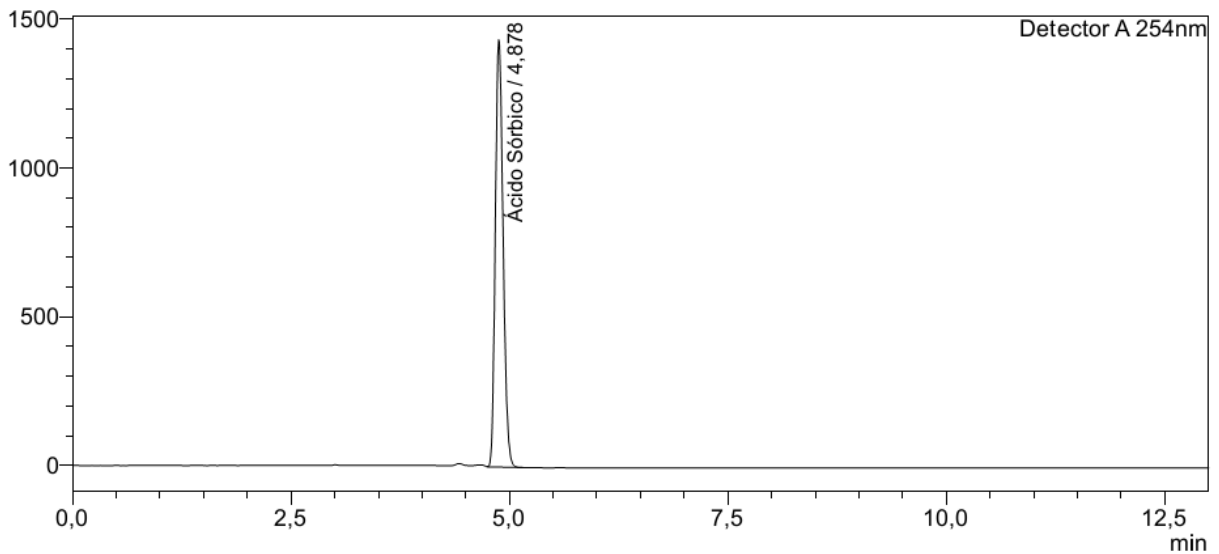
Tabela 12. Concentração de benzoato em diferentes alimentos e estimativa da ingestão diária baseada nos dados de consumo diário médio do IBGE (2011).

Amostra	n	Concentração máxima permitida mg kg ⁻¹	Benzoato - mg kg ⁻¹		Faixa de RSD (%)	IDM	EDI	
			Média	Faixa		g pessoa ⁻¹ dia ⁻¹	mg kg ⁻¹ peso corporal ⁻¹	
Laticínios	Margarina	3	1000	202	nd-362	0,4-4,3	6,6	0,02
	Doce de leite	3	1000	17	nd-50	0-3,2	5,5	0,002
Bebidas não alcoólicas	Suco de fruta	6	500	338	158-468	0,2-6,5	145	0,8
	Refrigerante	9	500	144	nd-260	0,2-3,1	94,7	0,2
	Energético	3	500	221	218-224	0,1-0,5	2,7	0,01
	Bebida isotônica	3	500	78	nd-234	0-0,5	2,7	0,004
Molhos e condimentos	Ketchup	4	1000	198	nd-792	0-0,7	0,5	0,002
	Mostarda	3	1000	632	181-936	0,2-1,1	0,5	0,005
	Molho shoyu	3	1000	1059	452-2040	0,5-1,0	0,5	0,009
Doces e geleias	Geleia de fruta	3	1000	101	nd-302	0-1,1	2,3	0,004
	Doce de fruta	3	1000	557	293-733	0,5-3,4	2,3	0,02
Conservas	Azeitona	4	1000	315	nd-858	0-3,5	0,6	0,003
Fast Food	Bebida	3	1000	29	nd-87	0-0,2	94,7	0,05
Adoçantes artificiais	Adoçante de mesa líquido	5	2000	671	67-1248	0,1-1,3	0,9	0,01
Total								1,18

n – número de amostras avaliadas, IDM – Ingestão Diária Média, EDI – Estimativa da Ingestão Diária, do inglês *Estimate of Daily Intake*, n.d. – não detectado (< LD)

Todos os derivados lácteos apresentaram concentrações de sorbato acima do LOQ. Em geral, as concentrações variaram entre $< LD$ até 3185 mg kg^{-1} , com $RSD \leq 19,6\%$. Um exemplo de cromatograma para a determinação do conservante sorbato pode ser visto na Figura 20, para uma amostra de requeijão. Ding e colaboradores determinaram sorbato em amostras de molho *shoyu* comercializadas na China em concentrações que variaram de $246,4$ a $311,7 \text{ mg kg}^{-1}$ empregando LLE e HPLC-UV (DING *et al.*, 2015), enquanto que no método empregando DLLME e GC-MS eles determinaram em uma amostra a concentração de $256,4 \text{ mg kg}^{-1}$ (DING *et al.*, 2018). Javanmardi e colaboradores determinaram sorbato em 50,3% das amostras de refrigerante, leite UHT, ketchup e pão comercializadas no Irã, em concentrações entre $0,8$ e 2305 mg L^{-1} (JAVANMARDI *et al.*, 2015). Tfouni e Toledo determinaram sorbato em amostras de refrigerante, margarina, suco de fruta, iogurte, *petit suisse* e queijo, com concentrações de até 1371 mg kg^{-1} , sendo as maiores concentrações também observadas para as amostras de queijo (TFOUNI e TOLEDO, 2002a). Kamankesh e colaboradores determinaram sorbato em 25% das amostras de iogurte avaliadas empregando DLLME e HPLC, em concentrações entre $3,4$ e 45 mg L^{-1} (KAMANKESH *et al.*, 2013). Abedi e colaboradores determinaram sorbato em todas as amostras de derivados de leite avaliadas empregando DLLME e GC-FID, em concentrações entre $1,50$ e $9,85 \text{ mg kg}^{-1}$ (ABEDI *et al.*, 2014). Os valores determinados neste trabalho estão consistentes com os dados da literatura.

Figura 20. Cromatograma para uma amostra de requeijão, positiva para o conservante sorbato (681 mg kg^{-1}).



Para as amostras de *fast food*, que neste trabalho consistiram de hambúrguer, bebida, batata frita e sorvete, o conservante benzoato foi determinado apenas nas amostras de refrigerante, enquanto o sorbato foi determinado nas amostras de refrigerante e hambúrgueres em concentrações de até 200 mg kg^{-1} , provavelmente devido a adição de condimentos nos lanches, como ketchup, mostarda e maionese, que apresentaram concentrações de sorbato até 930 mg kg^{-1} neste trabalho. As amostras de sorvete apresentaram apenas baixas concentrações ($\leq 10 \text{ mg kg}^{-1}$) de metilparabeno.

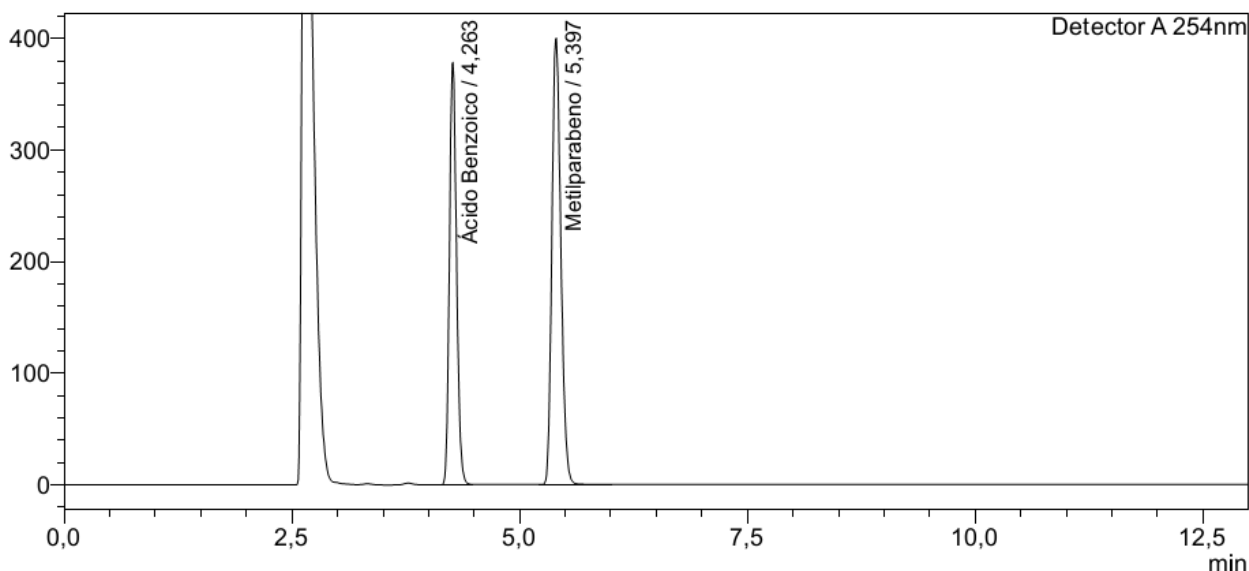
Tabela 13 Concentração de sorbato em diferentes alimentos e estimativa. da ingestão diária baseada nos dados de consumo diário médio do IBGE (2011).

Amostra	n	Concentração máxima permitida mg kg ⁻¹	Sorbato - mg kg ⁻¹		Faixa de RSD (%)	IDM	EDI	
			Média	Faixa		g pessoa ⁻¹ dia ⁻¹	mg kg ⁻¹ peso corporal ⁻¹	
Derivados lácteos	logurte	3	1000	283	148-416	0,8-1,9	9,8	0,05
	<i>Petit suisse</i>	3	1000	293	223-420	0,7-1,8	6,8	0,03
	Queijo	3	2000	1952	978-3185	6,1-19,6	6,8	0,22
	Margarina	3	500	431	227-722	0,9-4,1	6,6	0,05
	Bebida láctea	3	1000	322	221-386	0,3-2,4	1,0	0,01
	Requeijão	3	1000	697	681-719	0,5-1,9	6,8	0,08
	Doce de leite	3	1000	479	348-625	0,5-1,3	5,5	0,04
Bebidas não alcoólicas	Suco de fruta	6	1000	193	114-268	0,4-1,6	145	0,47
	Refrigerante	9	1000	48	nd-142	0-0,8	94,7	0,08
	Energético	3	1000	21	nd-64	0-0,6	2,7	0,001
	Bebida isotônica	3	1000	24	nd-71	0-0,7	2,7	0,001
Molhos e condimentos	Ketchup	4	1000	674	nd-930	0-13,5	0,5	0,01
	Mostarda	3	1000	102	nd-307	0-0,4	0,5	0,001
	Maionese	3	800	766	666-912	0,5-1,7	6,6	0,08
	Molho shoyu	3	1000	210	nd-629	0-0,2	0,5	0,002
Doces e geleias	Geleia de fruta	3	1000	202	0-605	0-2,3	2,3	0,01
	Doce de fruta	3	1000	460	340-646	0,5-3,1	2,3	0,02
Conservas	Azeitona	4	1000	152	4-255	0,6-2,2	0,6	0,002
Fast food	Sanduíche	3	-	184	173-199	0-10,9	11,8	0,04
	Bebida	3	1000	48	nd-144	0-0,5	94,7	0,08
Adoçantes artificiais	Adoçante de mesa líquido	5	1000	0.058	nd-0.3	0-2,6	0,9	8,6E-07
Total								1,25

n – número de amostras avaliadas, IDM – Ingestão Diária Média, EDI – Estimativa da Ingestão Diária, do inglês *Estimate of Daily Intake*, n.d. – não detectado (< LD)

Em relação aos parabenos, o metilparabeno, que foi determinado principalmente em amostras de adoçantes de mesa líquido, a concentração máxima permitida é de 1500 mg kg^{-1} . A Figura 21 apresenta um cromatograma de uma amostra de adoçante de mesa líquido, positiva para os conservantes benzoato e metilparabeno. Para as 5 amostras de adoçantes avaliadas neste trabalho a maior concentração determinada foi de 452 mg kg^{-1} . Para as demais amostras na qual o metilparabeno foi determinado, devido às baixas concentrações observadas, não se sugere que o mesmo esteja presente como um conservante. O etilparabeno, que também é permitido para uso como conservante em alimentos, foi determinado apenas em baixas concentrações ($< \text{LOQ}$). O propilparabeno, que foi banido recentemente para uso como conservante em alimento, não foi detectado em nenhuma das amostras avaliadas. A Tabela 14 apresenta os resultados obtidos para a determinação de metilparabeno em alimentos processados. As concentrações variaram entre não detectado ($< \text{LQ}$) até 452 mg kg^{-1} , com $\text{RSD} \leq 5,0\%$.

Figura 21. Cromatograma para uma amostra de adoçante de mesa líquido, positiva para os conservantes benzoato (429 mg kg^{-1}) e metilparabeno (452 mg kg^{-1}).



Da mesma forma que foi observada neste trabalho, a concentração de parabenos nas amostras de alimentos é geralmente baixa, além da sua presença ser limitada a alguns alimentos, diferentemente dos conservantes sorbato e benzoato. Jain e colaboradores determinaram metilparabeno em uma amostra de suco de fruta na

concentração de 0,13 mg L⁻¹ e propilparabeno em uma amostra de molho de tomate na concentração de 26,1 mg kg⁻¹ empregando DLLME e GC-FID, confirmando por GC-MS (JAIN *et al.*, 2013). Ye e colaboradores determinaram parabenos em amostras de molho de frutos do mar comercializadas em diferentes regiões da China, das quais apenas uma amostra apresentou o etilparabeno na concentração de 0,12 mg L⁻¹ empregando UAE e HPLC-PDA (YE *et al.*, 2015). He e colaboradores determinaram parabenos (metil, etil e propil) em amostras de molho shoyu na faixa de 0,011 a 0,014 mg L⁻¹ empregando SPME e GC-FID (HE *et al.*, 2012). Liao e colaboradores realizaram um estudo abrangente para determinação de parabenos em diversas amostras de alimentos adquiridas na China e nos Estados Unidos, das quais foi possível determinar os parabenos em mais de 90% das amostras para ambos os estudos, porém, em baixas concentrações, na ordem de ng g⁻¹ (LIAO *et al.*, 2013a; LIAO *et al.*, 2013b). Das oito amostras de alimentos avaliadas por Ding e colaboradores apenas uma amostra de vinagre apresentou concentração de etilparabeno de 69,6 mg kg⁻¹ (DING *et al.*, 2018). Yang e colaboradores determinaram seis parabenos em 19 amostras de alimentos, dos quais o metil e o etilparabeno foram os principais parabenos determinados, em concentrações entre 56,9 e 312,6 mg kg⁻¹. Eles também determinaram alguns parabenos que são proibidos para uso em alimentos, como o propilparabeno e o isopropilparabeno, com concentrações entre 52,3 e 170,6 mg kg⁻¹ (YANG *et al.*, 2014).

Tabela 14. Concentração de metilparabeno em diferentes alimentos e estimativa da ingestão diária baseada nos dados de consumo diário médio do IBGE (2011).

Amostra		N	Concentração máxima permitida mg kg ⁻¹	Metilparabeno - mg kg ⁻¹		Faixa de RSD (%)	IDM	EDI
				Média	Faixa		g pessoa ⁻¹ dia ⁻¹	mg kg ⁻¹ peso corporal ⁻¹
Bebidas não alcoólicas	Energético	3	300	2	1,3-2,3	0,4-1,8	2,7	0,00008
Doces e geleias	Doce de fruta	3	-	1	nd-1,8	0-1,4	2,3	0,00004
Conservas	Azeitona	4	-	1	0,7-1,4	0,5-5,0	0,6	0,00001
Fast Food	Sorvete	3	-	4	nd-10	0-1,3	4,6	0,0003
Adoçantes artificiais	Adoçante de mesa líquido	5	1500	193	nd-452	0-0,7	0,9	0,003
							Total	0.003

n – número de amostras avaliadas, IDM – Ingestão Diária Média, EDI – Estimativa da Ingestão Diária, do inglês *Estimate of Daily Intake*, n.d. – não detectado (< LD)

5.1.5. Estimativa da ingestão diária de conservantes

Usando os dados de concentração média obtidos na determinação de conservantes em alimentos empregando QuEChERS e HPLC-UV e dos dados mais atualizados da Pesquisa de Orçamentos Familiares, realizada pelo IBGE, o qual contém dados sobre o consumo de alimentos, expressos em g *per capita* por dia, para diferentes categorias, como consumo médio nacional, foi realizado o cálculo da EDI, conforme descrito no item 4.8.7. Os resultados obtidos para essa avaliação são reportados nas Tabelas 12, 13 e 14, para o benzoato, sorbato e metilparabeno, respectivamente.

Embora para alguns conservantes em alimentos a concentração determinada seja elevada, sendo permitido pela legislação concentrações de até 2000 mg kg⁻¹ para os alimentos avaliados neste trabalho, a EDI determinada não ultrapassou a IDA para nenhum dos conservantes em estudo. Em resumo, os maiores valores de EDI foram observados para o benzoato, com aproximadamente 25% da IDA, enquanto para o sorbato a EDI obtida foi de 5% da IDA e para os parabenos a EDI foi bem menor que 1% da IDA. É importante enfatizar que esses valores de EDI foram obtidos considerando os dados médios, tanto de consumo de cada um dos alimentos (IDM) quanto os valores determinados para os alimentos em estudo. Além disso, procurou-se trabalhar com amostras que apresentavam conservantes em sua composição, sem ter sido realizado um estudo de mercado a respeito das marcas mais vendidas. Mesmo assim, a EDI para o benzoato, que apresentou os maiores valores neste trabalho em comparação com a IDA, está de acordo com a faixa de 0,18 a 2,3 mg kg⁻¹ peso corporal⁻¹ identificada pelo JECFA como ideal para consumidores deste conservante (WHO, 2016), e para os demais conservantes não foram observados valores discrepantes daqueles observados por outros estudos.

Quando se trata de consumidores extremos das principais fontes de benzoatos, como os refrigerantes e os sucos, que representaram 85% da EDI, os dados de IDM não são apropriados. As Diretrizes para Estudo da Ingestão Diária de Contaminantes Químicos (*Guidelines for the Study of Dietary Intake of Chemicals Contaminants*) sugere multiplicar a EDI por 3 para se obter uma estimativa em relação a consumidores extremos (WHO, 1985). Desta forma, a ingestão de 3,54 mg

kg^{-1} peso corporal⁻¹, correspondente a 71% da IDA, foi estimada para o benzoato. Outros estudos sugerem ainda elevado consumo de bebidas não alcoólicas, até 2 L por indivíduo (CAMARGO *et al.*, 1999). Levando em consideração este dado, consumidores extremos de refrigerante ($4,8 \text{ mg kg}^{-1}$ peso corporal⁻¹ – 96% da IDA) e suco de fruta ($11,3 \text{ mg kg}^{-1}$ peso corporal⁻¹ – 226% da IDA) poderiam estar ingerindo quantidades de conservantes maiores que aquelas recomendadas pelo JECFA.

As bebidas não alcoólicas representam a principal fonte de exposição aos benzoatos na maioria dos países (WHO, 2016), o que também foi observado neste trabalho, com contribuição de aproximadamente 85%. Tfouni e Toledo observaram para as amostras determinadas que o refrigerante contribuiu com mais de 80% da EDI, em um dos poucos estudos desta natureza realizados no Brasil (TFOUNI e TOLEDO, 2002b). Lazarevic e colaboradores realizaram a EDI de benzoato na população adulta do sudeste da Sérvia, através da coleta de dados de ingestão alimentar de 620 adultos entre 18 e 65 anos e análise de 748 amostras. Foi observado a EDI de $0,36 \text{ mg kg}^{-1}$ peso corporal⁻¹, que representa 7,2% da IDA. Os principais contribuintes da ingestão de benzoato foram as bebidas não alcoólicas (43,1%), ketchup e produtos a base de tomate (36,1%) e conservas domésticas (19,4%) (LAZAREVIĆ *et al.*, 2011).

Em estudo realizado na Dinamarca, Leth e colaboradores avaliaram a EDI de benzoato e sorbato. Foram realizados 17 avaliações entre 2001 e 2006, com um total de 1526 amostras, das quais 3% estiveram acima das concentrações máximas permitidas. Os dados de ingestão diária utilizados foram obtidos com a Pesquisa Nacional Dinamarquesa de Hábitos Alimentares e Atividade Física (*Danish National Survey of Dietary Habits and Physical Activity*), com 5785 indivíduos entre 4 e 75 anos. Em geral, os autores observaram que as EDI estavam dentro da IDA para ambos os conservantes, e, que os refrigerantes foram um dos principais contribuintes para a ingestão de benzoatos (LETH *et al.*, 2010). Conclusões semelhantes foram obtidas em estudos realizados em outros países (BEMRAH *et al.*, 2008; CRESSEY e JONES, 2009; MISCEK e KRAPFENBAUER-CERMAK, 2011; LING *et al.*, 2015; OKTAVIANY *et al.*, 2018).

Embora a EDI avaliada neste trabalho não tenha considerado a faixa etária, é um consenso que as crianças são mais facilmente expostas aos conservantes em

comparação aos adultos. Uma vez que a massa corporal média de 60 kg foi utilizada neste trabalho, a EDI pode não refletir a realidade do consumo de uma criança, que, em geral, apresenta massa corporal bem inferior. Sendo assim, crianças que consomem elevadas quantidades de bebidas não alcoólicas industrializadas, como os refrigerantes e sucos, podem estar ingerindo quantidades acima da IDA. Da mesma forma, também é importante ressaltar que para este estudo foram selecionadas amostras levando em consideração o consumo, popularidade da marca e a presença dos conservantes na lista de ingredientes nas embalagens dos alimentos. Desta forma, é possível filtrar o consumo de conservantes pela seleção de alimentos que não contenham estes aditivos em sua composição.

5.2. Desenvolvimento de método para determinação de conservantes em alimentos processados empregando SILLME e HPLC-UV

Para a determinação de conservantes empregando a técnica SILLME foi utilizado o mesmo método cromatográfico desenvolvido para a determinação empregando QuEChERS. Desta forma, apenas os parâmetros envolvendo a extração foram avaliados.

5.2.1. Padronização da técnica SILLME de preparo de amostras

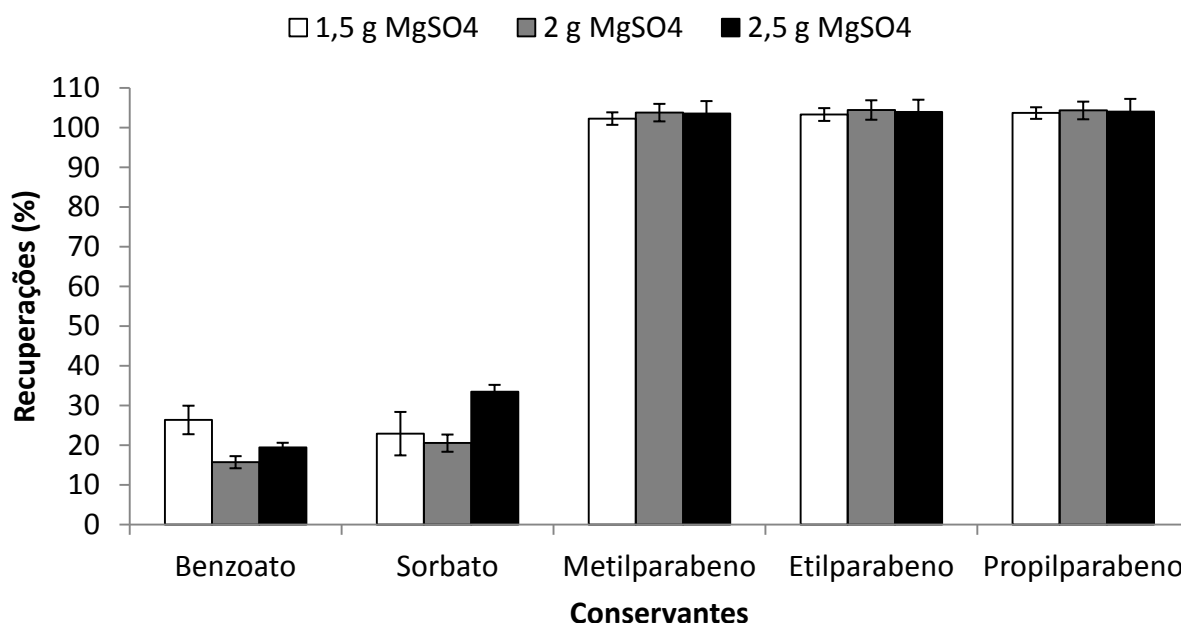
5.2.1.1. Influência da massa de $MgSO_4$ nas recuperações dos conservantes

A técnica desenvolvido por Du e colaboradores avaliou o uso de diferentes combinações de sais ($MgSO_4$, Na_2SO_4 , $(NH_4)_2SO_4$ e NH_4Cl O $MgSO_4$) e solventes (MeCN, acetona e isopropanol), tendo observado tanto a separação entre as fases orgânica e aquosa quanto recuperações satisfatórias apenas para as misturas de MeCN com $MgSO_4$ e acetona com Na_2SO_4 . Porém, a segunda combinação apresentou volume de extrato maior que o volume de solvente adicionado inicialmente (DU *et al.*, 2014). Da mesma maneira, foi avaliado em nosso grupo a combinação do $MgSO_4$ com outros solventes, como etanol e acetato de etila. Entretanto, também não foi observada separação de fases tão eficiente quanto é observada quando a MeCN é empregada. Outros fatores determinantes para o uso da MeCN como solvente extrator são a sua capacidade de precipitar proteínas,

polaridade favorável para a extração de ampla faixa de compostos, boa solubilidade em água e baixa toxicidade. Ainda, uma vez que uma das fases móveis empregada no sistema de cromatografia líquida é a MeCN, é interessante que a amostra esteja no mesmo solvente. Desta forma, foram fixados como solvente e sal, respectivamente, a MeCN e o MgSO_4 .

O MgSO_4 é o responsável por causar a separação de fases na técnica SILLME. Desta forma, deve ser adicionada quantidade mínima o suficiente para saturar a amostra e, por consequência, promover tal fenômeno. Assim, foram avaliados o uso de 1,5, 2,0 e 2,5 g de MgSO_4 , conforme procedimento descrito no item 4.9.2. Os resultados obtidos para esta avaliação são apresentados na Figura 22.

Figura 22. Influência da massa de MgSO_4 nas recuperações dos conservantes empregando a SILLME. Experimentos foram realizados utilizando 0,5 g de leite UHT fortificado a 10 mg kg^{-1} , 4,5 mL de água ultrapura e 1 mL de MeCN. As barras de erro indicam RSD (%).



Pode ser observado que os três parabenos em estudo foram extraídos de forma eficiente, independentemente da quantidade de MgSO_4 empregada. Entretanto, para o benzoato e o sorbato, baixas recuperações foram observadas,

provavelmente devido à ionização destes compostos em meio aquoso, uma vez que o pH da amostra não foi avaliado nesta etapa e o pKa destes conservantes é baixo (< 4,8). Desta forma, seria necessário realizar alguma modificação no pH das amostras para promover a extração do benzoato e sorbato. Assim, foi selecionado 2 g de MgSO₄ para garantir a saturação da fase aquosa em relação ao uso de 1,5 g e economizar reagente em relação ao uso de 2,5 g.

Du e colaboradores utilizaram 2 g de MgSO₄ para promover a separação das fases no método SILLME desenvolvido para a determinação de fluoroquinolonas em amostras de água, alimentos e matrizes biológicas (DU *et al.*, 2014). Outros trabalhos que empregam técnicas envolvendo o efeito *salting-out* utilizam diferentes combinações de sais e solvente na extração (Tabela 4). Mariño-Repizo e colaboradores empregaram uma mistura de 1,5 mL de tolueno, 3,5 mL de acetona e 1,0 g de (NH₄)₂SO₄ para a determinação de ocratoxina A em amostras de cerveja por UHPLC-MS/MS (MARIÑO-REPIZO *et al.*, 2018). Koltsakidou e colaboradores utilizaram 1,7 mL de MeCN e 1 g de NaCl na determinação de HPAs em de mel (KOLTSAKIDOU *et al.*, 2015). Akram e colaboradores empregaram uma combinação de MeCN, NaCl e Na₂SO₄ na determinação de tiacloprido, um inseticida, em frutas e vegetais (AKRAM *et al.*, 2017). Tighrine e colaboradores determinaram conservantes e adoçantes artificiais em amostras de suco utilizando 1,7 g de (NH₄)₂SO₄ e 0,5 mL de uma mistura de acetona e etanol (1:1, v:v) (TIGHRINE *et al.*, 2019).

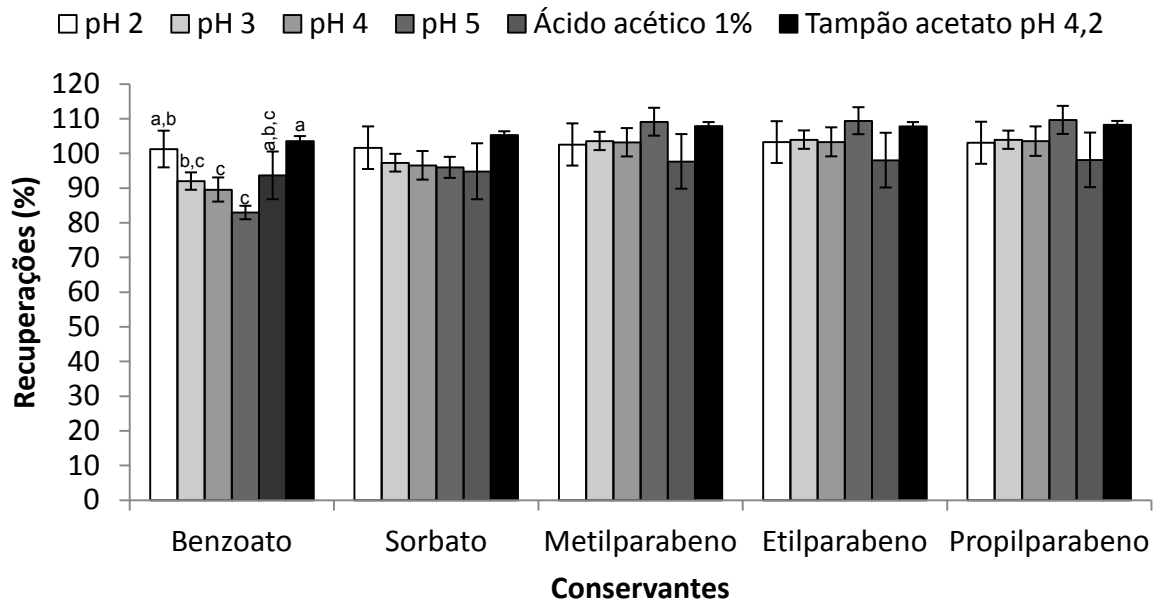
5.2.1.2. Influência do pH na recuperação dos conservantes

Foi avaliado o pH da solução aquosa adicionada nas amostras para o método SILLME, conforme descrito no item 4.9.3. Apenas durante a avaliação empregando pH 6 não foi possível retirar o sobrenadante, devido a precipitação de substâncias que impediram a separação das fases. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 23.

De forma resumida, todos os conservantes apresentaram recuperações satisfatórias independentemente da condição de ajuste de pH utilizada (entre 83 a 110%). Apenas o conservante benzoato apresentou diferença significativa nos resultados ($p < 0,05$). Pode ser observado na Figura 23 que os melhores resultados foram obtidos quando a solução tampão acetato pH 4,2 foi utilizada, sendo estatisticamente equivalente ao uso de solução pH 2 e solução de ácido acético 1%

($p > 0,05$). Entretanto, foi escolhido trabalhar com a solução tampão acetato pH 4,2 devido aos menores valores de RSD obtidos, entre 1,0 e 1,4%, comparado com a solução pH 2 (5,3 a 6,1%) e solução ácido acético 1% (7,3 a 8,5%). Além disso, quando utilizada a solução tampão acetato pH 4,2, pode ser observada a maior precipitação de coextrativos em comparação as demais opções avaliadas.

Figura 23. Influência do pH nas recuperações dos conservantes empregando a técnica SILLME. Experimentos foram realizados utilizando 0,5 g de leite UHT fortificado a 10 mg kg^{-1} , 4,5 mL de água ultrapura nos diferentes valores de pH, 2 g de MgSO_4 e 1 mL de MeCN. As barras de erro indicam RSD (%). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).



O pH desempenha um papel fundamental na eficiência de extração dos analitos da fase aquosa para a fase orgânica. De maneira geral, para melhorar a extração dos compostos, o pH da amostra deve ser variado de maneira a suprimir a ionização de espécies ácidas ou básicas. Enquanto os parabenos apresentam pKa acima de 8,0, o benzoato e o sorbato apresentam pKa 4,21 e 4,26, respectivamente, em suas formas ácidas (Tabela 5). Desta forma, é esperado que em pH ácido os analitos se apresentassem em sua maioria na forma molecular. Porém, quando analisamos o gráfico de espécies em função do pH (Figura 8), percebemos que no

pH 4,2 utilizado, a concentração de benzoato e sorbato na forma molecular são de aproximadamente 50% e 80%, respectivamente, se apresentando em equilíbrio com seus respectivos ânions, mais polares. Mesmo assim, devido à elevada força iônica do meio, saturado pelos íons Mg^{2+} , SO_4^{2-} e da própria solução tampão, é possível obter recuperações na volta de 100% para esses dois analitos. Também pode ser observado, tanto para o benzoato quanto para o sorbato, ligeiro decréscimo nas recuperações conforme o pH vai aumentando de 2 para 5, sendo estatisticamente diferente para o benzoato ($p < 0,05$) e estatisticamente equivalente para o sorbato ($p > 0,05$).

Devido ao comportamento ácido dos conservantes benzoato e sorbato, a maioria dos trabalhos que realizam a determinação destes compostos emprega alguma etapa de acidificação do meio. Ding e colaboradores ajustaram o pH das amostras de alimentos avaliadas empregando solução de HCl 1 mol L^{-1} até 4,0 para a determinação de conservantes empregando DLLME, seguido da adição de 0,5 g de NaCl, responsável por promover a migração dos analitos para a fase orgânica (DING *et al.*, 2018). Javanmardi e colaboradores realizaram procedimento semelhante de acidificação da amostra a pH 4,0 e posterior adição de 0,75 g de NaCl (JAVANMARDI *et al.*, 2015). Para estes dois trabalhos apresentados, pelo gráfico de espécies para os conservantes sorbato e benzoato, sugere-se decréscimo nas recuperações para estes compostos. Entretanto, os autores obtêm recuperações entre 96 e 107% e 101 e 106%, respectivamente. Kamankesh e colaboradores observaram através de planejamento experimental que há uma relação entre a concentração de NaCl adicionada e o pH do meio para a determinação dos conservantes sorbato e benzoato (KAMANKESH *et al.*, 2013). Assim, mesmo que o pH não seja ácido o suficiente para garantir que estes conservantes não estejam ionizados, é possível obter recuperações satisfatórias devido ao efeito *salting-out*, ocasionado pela elevada concentração de sais presentes, tanto nas técnicas mencionadas quanto neste trabalho.

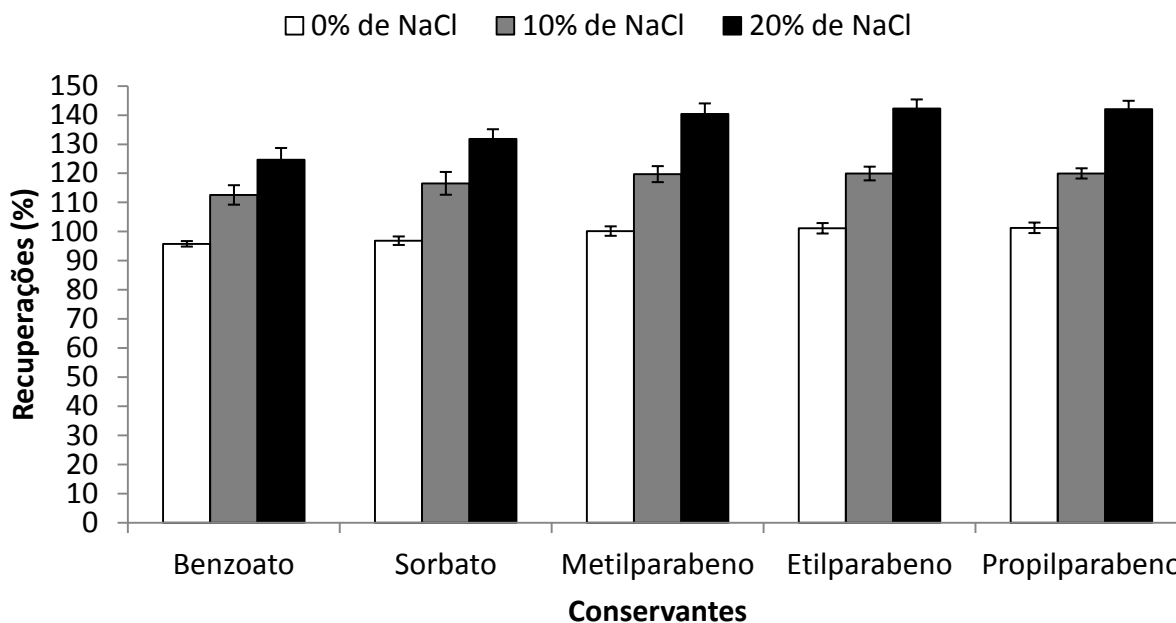
Para os parabenos não foram observadas diferenças significativas nas recuperações ($p > 0,05$) independentemente do pH utilizado. Devido ao elevado valor de pKa dos parabenos, seria necessário pH a partir de 7 para causar a desprotonação do grupamento hidroxila dos parabenos. Para avaliações em pH ácido, a protonação da carbonila ocorre abaixo de 3, entretanto, ela é menos evidente para os parabenos de cadeia curta (BŁĘDZKA *et al.*, 2014; GRECCO *et al.*,

2018). Desta forma, a determinação dos parabenos pode ser realizada em diferentes faixas de pH. Grecco e colaboradores empregaram pH 4,0 para a determinação de parabenos em amostras de leite materno empregando DLLME e UHPLC-MS/MS (GRECCO *et al.*, 2018). Yin e colaboradores empregaram pH 7,0 na determinação de parabenos em bebidas por UHPLC-MS/MS (YIN *et al.*, 2017). Já Ye e colaboradores nem avaliaram qual é o pH ótimo para a determinação dos parabenos em amostras de molhos de frutos do mar empregando LLE e UPLC-UV, provavelmente devido a ampla faixa de estabilidade de pH dos parabenos (YE *et al.*, 2015). Neste trabalho, as recuperações para os parabenos não foram levadas em conta na decisão, uma vez que não houve diferença entre os experimentos e os resultados estarem de acordo com o que está disponível na literatura. Assim, foi selecionado o uso da solução tampão acetato pH 4,2, devido aos valores de recuperação e RSD obtidos. Além disto, o fato das soluções tampões não sofrerem alteração de pH mesmo quando são adicionados ácidos ou bases ao meio é uma característica interessante no desenvolvimento de métodos para determinações em diferentes amostras de alimento, uma vez que o pH do extrato pode ser alterado de acordo com a característica do alimento ao qual é submetido à extração.

5.2.1.3. Influência da adição de NaCl na recuperação dos conservantes

Um dos parâmetros que influencia a extração no método desenvolvido é a força iônica do meio. O $MgSO_4$ adicionado apresenta importância inicialmente por promover a separação das aquosa e orgânica, além de promover a migração dos analitos, pelo efeito *salting-out*. Embora as recuperações já fossem satisfatórias antes desta avaliação, algumas amostras com elevada concentração de sal poderiam comprometer os resultados. Assim, foi realizado um teste para saber até qual concentração de NaCl na amostra o método se comportaria de forma adequada. Foi avaliada a adição de NaCl até a concentração de 20%. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 24.

Figura 24. Influência da adição de NaCl nas recuperações dos conservantes empregando a SILLME. Experimentos foram realizados utilizando 0,5 g de leite UHT fortificado a 10 mg kg^{-1} , 4,5 mL de solução tampão acetato pH 4,2, 2 g de MgSO_4 e 1 mL de MeCN. As barras de erro indicam RSD (%).



Na Figura 24, observa-se uma tendência no aumento das recuperações com o aumento da concentração de NaCl adicionada a amostra. Recuperações entre 96 e 101% ($\text{RSD} \leq 1,8\%$) foram obtidas quando não foi adicionado NaCl. Quando é adicionado NaCl na concentração de 10%, as recuperações variaram entre 113 a 120% ($\text{RSD} \leq 3,4\%$). Para a adição de 20% de NaCl as recuperações variaram entre 125 e 142% ($\text{RSD} \leq 3,2\%$). Isto provavelmente ocorreu devido ao aumento de coextrativos quando aumentou a concentração de NaCl no meio. Uma vez que o procedimento envolve a extração de 0,5 g de amostra, a quantidade de NaCl proveniente da amostra dificilmente causaria variações nas recuperações. Desta forma, optou-se por não adicionar NaCl na extração.

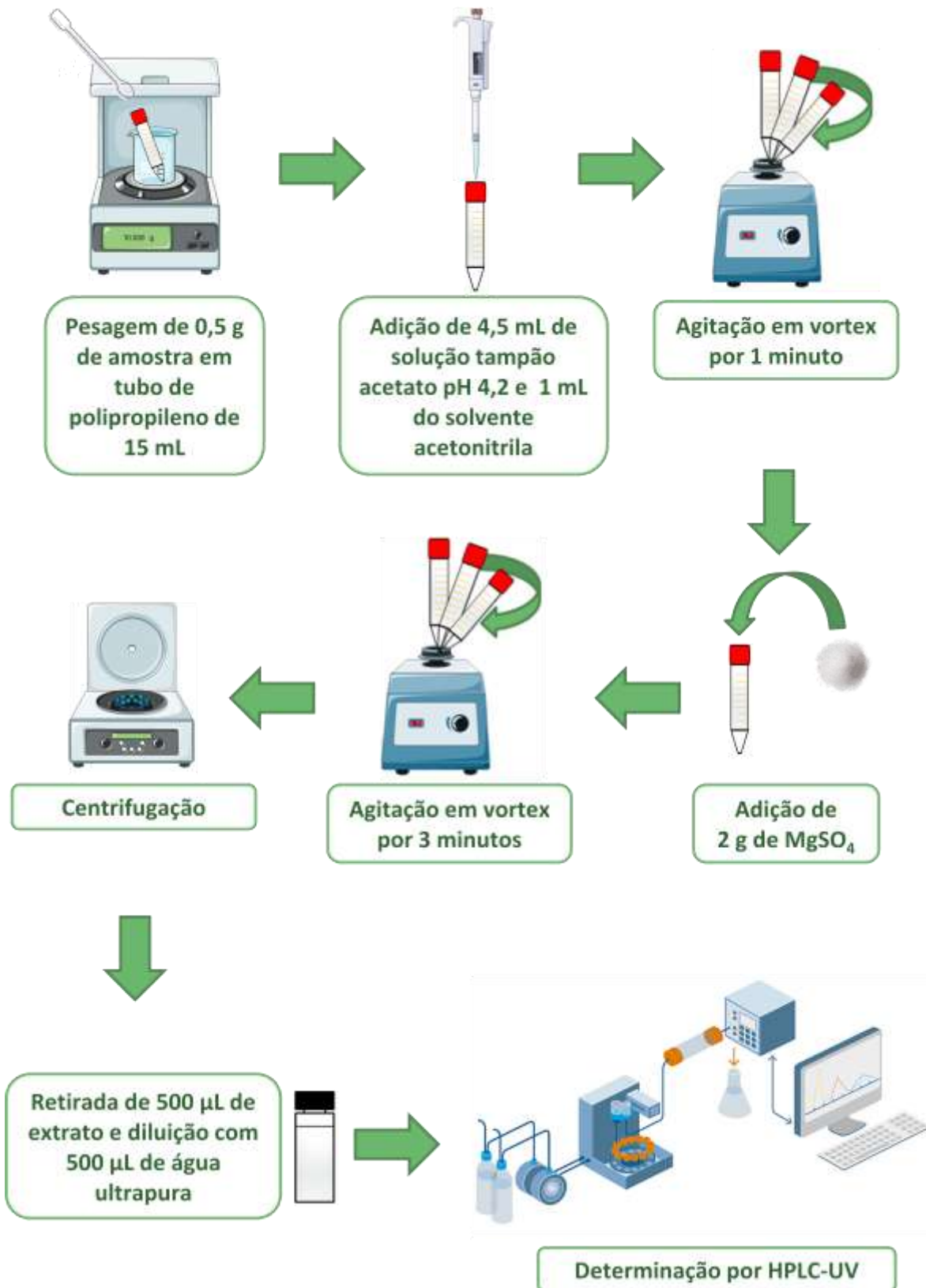
5.2.1.4. Método SILLME padronizado

A partir dos testes realizados, foi possível avaliar as melhores condições para a extração e determinação de conservantes em alimentos. Foram avaliadas a massa de MgSO_4 , pH e adição de NaCl. As etapas do procedimento padronizado estão descritas na Figura 25.

O método consiste na homogeneização das amostras em solução tampão pH 4,2, extração com um pequeno volume de MeCN, partição pela adição de MgSO_4 e diluição, para posterior determinação por HPLC-UV. O método se caracteriza pela miniaturização, sendo reduzido o volume de solvente e amostra empregado, consequentemente, a quantidade de resíduos gerados.

Uma vez que todo o método foi desenvolvido utilizando amostras de leite UHT integral, em seguida foi avaliado o comportamento do método proposto frente a diferentes matrizes.

Figura 25. Esquema do método SILLME padronizado para determinação de conservantes em alimentos



5.2.1.5. Avaliação do método SILLME frente a diferentes amostras

Com o objetivo de comparar o método SILLME proposto com o método QuEChERS, foi realizada a avaliação do método frente às mesmas amostras isentas de conservantes, representativas das diferentes classes de alimentos selecionados para este trabalho. As amostras foram fortificadas em triplicata na concentração de 10 mg kg^{-1} e submetidas ao método SILLME modificado conforme descrito na Figura 25, além de ensaios em branco para confirmar a ausência de conservantes ou qualquer outro pico no mesmo tempo de retenção. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 15.

Como pode ser observado, foram obtidas recuperações entre 87 e 104%, com RSD menores que 5,2% para todos os conservantes em estudo nas amostras avaliadas. Da mesma forma que para o método QuEChERS, independentemente das características da amostras ao qual o método foi aplicado, as recuperações obtidas foram satisfatórias, dentro da faixa de 70 a 120%, considerada ideal quando se trabalha com determinações de resíduos e contaminantes empregando técnicas cromatográficas (SANTE, 2017).

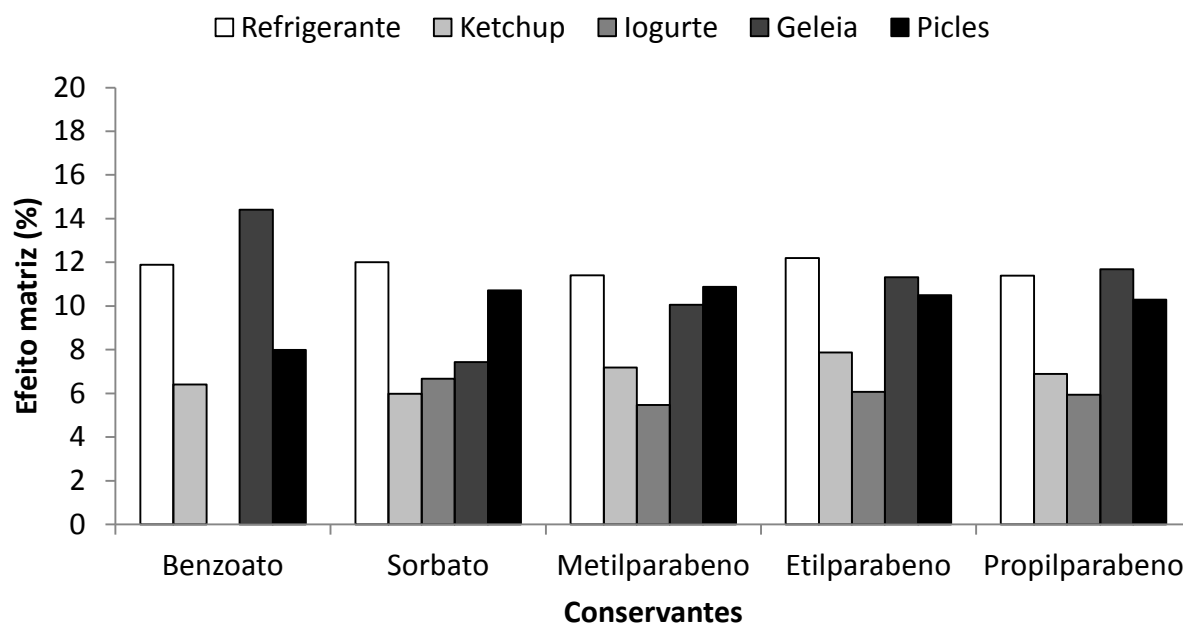
Também foi avaliado o efeito matriz, conforme descrito na Equação 11, através da comparação dos padrões preparados no extrato e na fase móvel. Conforme pode ser observado na Figura 26, o efeito matriz foi de no máximo 14%, para os 5 conservantes nas 5 amostras avaliadas, sendo considerados baixos valores de efeito matriz (ECONOMOU *et al.*, 2009). Desta forma, é possível quantificar as amostras pelo método SILLME pelas curvas analíticas preparadas na fase móvel.

Após esta etapa de padronização, o método foi submetido ao procedimento de validação, para garantir a confiabilidade dos resultados gerados.

Tabela 15. Recuperações (R%) e desvio padrão relativo (RSD) para os conservantes em diferentes alimentos processados empregando o método SILLME de preparo de amostras. Experimentos foram realizados em triplicata na concentração de 10 mg kg⁻¹ para cada conservante em cada amostra.

Amostra	Benzoato		Sorbato		Metilparabeno		Etilparabeno		Propilparabeno	
	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)
Refrigerante	93	1,1	94	0,8	95	0,6	95	0,8	96	0,9
Ketchup	98	3,1	104	3,8	99	4,0	99	4,0	99	4,2
logurte	92	1,9	92	3,9	95	3,9	95	4,0	95	3,9
Geleia de fruta	90	2,6	91	4,5	91	4,9	92	5,2	91	4,9
Picles	91	1,4	90	0,5	91	0,5	89	0,6	87	0,8

Figura 26. Avaliação do efeito matriz na determinação de conservantes frente a diferentes amostras no método SILLME



5.2.2. Validação do método empregando SILLME e HPLC-UV para determinação de conservantes em alimentos

5.2.2.1. Limites de detecção e quantificação

Uma vez que foi utilizada a mesma condição cromatográfica empregada no método QuEChERS, os LD_i e LQ_i foram os mesmos, que variaram entre 0,002 e 0,005 $mg L^{-1}$ e 0,006 e 0,016 $mg L^{-1}$, respectivamente. As curvas analíticas obtidas inicialmente (Tabela 10) foram reavaliadas através da verificação da concentração de amostras fortificadas extraídas pela SILLME, sendo as mesmas utilizadas para as determinações por ambos os métodos. Para os LD_m e LQ_m , foi considerado todo o procedimento, envolvendo o método de preparo de amostra por SILLME. Um fator de diluição de 4 vezes é aplicado, uma vez que 0,5 g de amostra é extraído com 1 mL de MeCN, e, ao final da extração, 500 μL são diluídos a 1 mL com água ultrapura. A Tabela 16 apresenta os dados obtidos para os LQ_m , que variaram de 0,03 a 0,07 $mg kg^{-1}$, 5 vezes menores que aqueles obtidos para o método QuEChERS.

Tabela 16. Limite quantificação do método (LQ_m), faixa linear, exatidão, em termos de recuperação (R%), precisão do método, em termos de repetibilidade (RSD_r) e precisão intermediária (RSD_{pi}) e incerteza da medição (U%). Experimentos foram realizados em triplicata utilizando como amostra representativa o leite UHT integral, isenta de conservantes.

Conservante	LQ_m mg kg ⁻¹	Faixa linear mg kg ⁻¹	Repetibilidade						Precisão intermediária							
			0,2 mg kg ⁻¹		1,0 mg kg ⁻¹		2,0 mg kg ⁻¹		U _r %	0,2 mg kg ⁻¹		1,0 mg kg ⁻¹		2,0 mg kg ⁻¹		U _{pi} %
			R%	RSD _r	R%	RSD _r	R%	RSD _r		R%	RSD _{pi}	R%	RSD _{pi}	R%	RSD _{pi}	
Benzoato	0,07	0,2-200	101	4,4	94	0,7	80	2,5	19,9	103	6,6	93	0,7	81	1,0	21,1
Sorbato	0,03	0,2-200	85	1,3	93	0,1	82	2,8	26,9	82	8,7	89	3,9	85	2,3	31,0
Metilparabeno	0,05	0,2-200	97	11,0	99	0,6	86	1,8	17,0	86	4,8	93	2,8	90	1,0	21,1
Etilparabeno	0,05	0,2-200	87	6,5	102	3,2	88	2,5	17,4	90	6,1	94	2,7	91	2,1	18,0
Propilparabeno	0,04	0,2-200	92	0,9	98	0,7	90	2,2	13,5	85	0,9	94	2,4	90	2,6	21,0

5.2.2.2. Curva analítica, linearidade e faixa de trabalho

A Tabela 16 apresenta além dos valores de LQ_m a faixa linear para as curvas analíticas pelo método SILLME. Os dados das curvas analíticas, preparadas na fase móvel são os mesmos já apresentados na Tabela 10. Uma vez que não foi observado efeito matriz para as diferentes amostras avaliadas pela SILLME e pela experiência observada no método QuEChERS da avaliação do efeito matriz por comparação entre as curvas analíticas, optou-se por não realizar a curva na matriz para o método SILLME. Assim, a faixa linear para cada um dos conservantes variou entre 0,2 e 200 mg kg⁻¹, já considerando o procedimento de extração. Da mesma forma, para amostras com concentrações maiores que esta uma diluição pode ser realizada.

5.2.2.3. Exatidão, precisão e incerteza das medições

Para avaliação da exatidão do método SILLME foram realizados ensaios de recuperação em três níveis, nas concentrações de 0,2, 1,0 e 2,0 mg kg⁻¹, representando 1, 5 e 10 vezes o primeiro ponto da faixa de trabalho, conforme procedimento padronizado descrito no item 5.2.1.4. A precisão do método foi avaliada em termos de repetibilidade (RSD), nos mesmos três níveis. Ambos os ensaios foram realizados em termos de repetibilidade e reprodutibilidade.

A validação do método SILLME foi realizada empregando apenas uma amostra de leite UHT integral. Entretanto, a exatidão do método SILLME foi posteriormente avaliada pela comparação de método em diferentes amostras de alimentos processados. A Tabela 16 apresenta os dados de exatidão e precisão para a amostra de leite UHT integral. As recuperações variaram entre 80 e 103%, com $RSD \leq 11\%$, para todos os conservantes, tanto na repetibilidade quanto na precisão intermediária. Estes dados estão de acordo com a orientação para validação de métodos cromatográficos, que considera satisfatórios valores de recuperação dentro da faixa entre 70 e 120% com $RSD \leq 20\%$ (SANTE, 2017). Seguindo as recomendações do Comitê Diretivo de Pesquisa em Ciência de Alimentos e Medicina Veterinária (*Foods And Veterinary Medicine Science and Research Steering Committee, FDA*), os resultados obtidos se mostram adequados

para determinações de conservantes em análises de rotina, uma vez que os valores de exatidão e precisão estão dentro da faixa de 80 a 110%, com RSD menores que 8% para o nível 1 mg kg^{-1} e 11% para o nível $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ (FDA, 2015). A incerteza das medições associada com a quantificação foi $\leq 31,0\%$ para o método proposto (Tabela 16) para a amostra de leite UHT integral, estando de acordo com as diretrizes do SANTE, confirmando a capacidade do método em fornecer resultados confiáveis (SANTE, 2017).

5.2.2.4. Seletividade da técnica SILLME

Da mesma forma que para o método QuEChERS, a avaliação da seletividade da técnica SILLME padronizada neste trabalho foi realizada pela comparação dos cromatogramas de amostras que não continham os conservantes em sua composição com as amostras fortificadas. As Figura 27, 28 e 29 apresentam cromatogramas representando a avaliação da seletividade da técnica SILLME padronizada para amostras de refrigerante, ketchup e picles, representando amostras líquidas, pastosas e sólidas, respectivamente. Nenhum sinal é observado nos mesmos tempos de retenção dos conservantes em estudo, confirmando a seletividade desta técnica. Para as demais amostras avaliadas o mesmo perfil foi observado.

Figura 27. Cromatogramas para uma amostra de refrigerante (a) branco e (b) fortificada na concentração de 10 mg kg^{-1} , submetida a SILLME padronizada

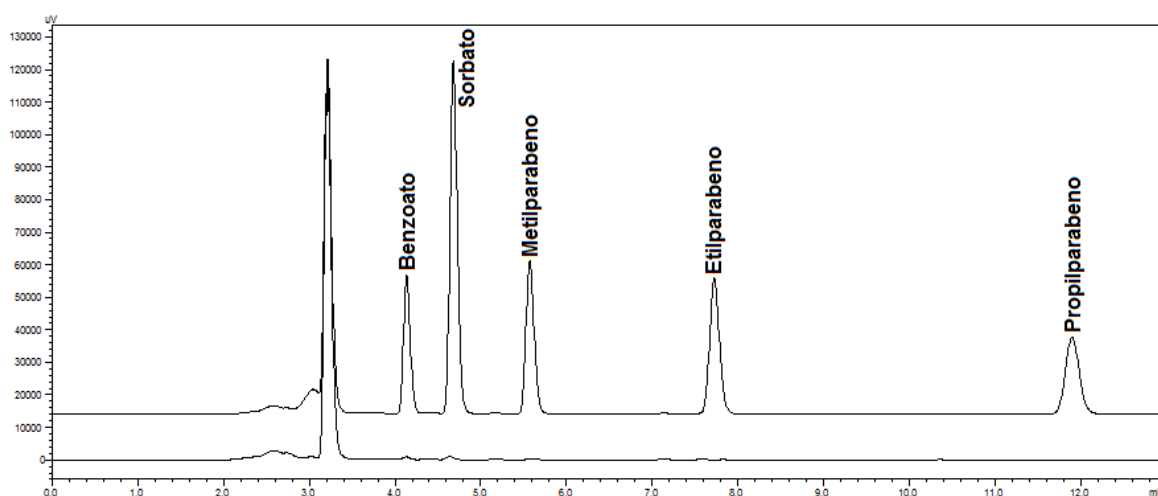


Figura 28. Cromatogramas para uma amostra de ketchup (a) branco e (b) fortificada na concentração de 10 mg kg^{-1} , submetida a SILLME padronizada

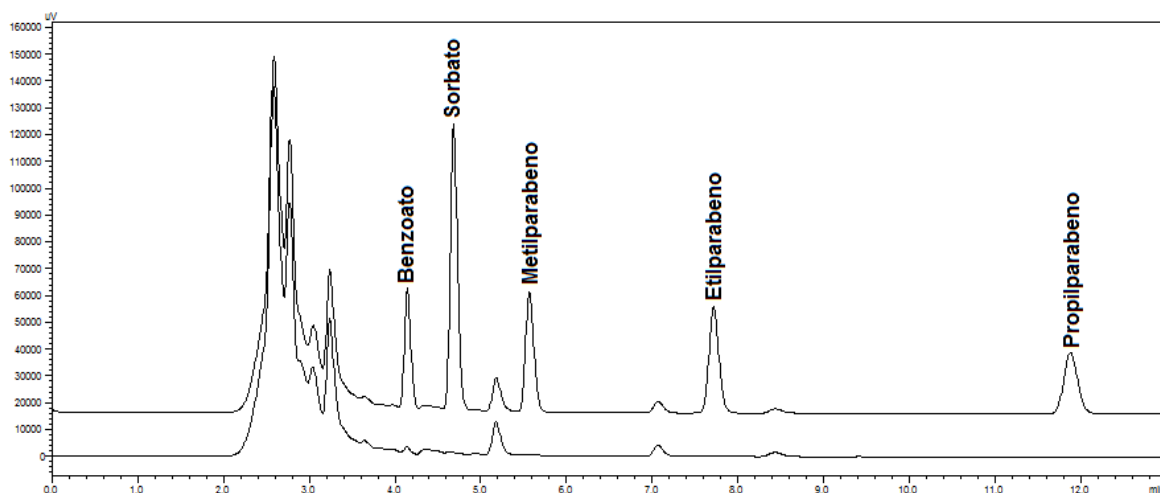
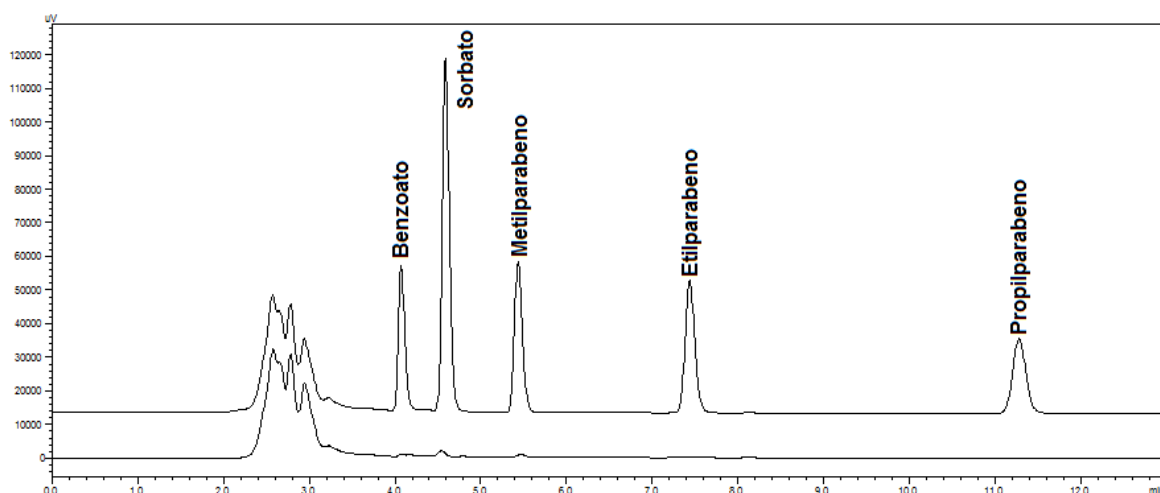


Figura 29. Cromatogramas para uma amostra de picles (a) branco e (b) fortificada na concentração de 10 mg kg^{-1} , submetida a SILLME padronizada



5.3. Comparação entre os métodos desenvolvidos

A exatidão de um método representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro, sendo sempre considerada dentro dos limites da precisão. Existem diferentes maneiras de se avaliar a exatidão de um método. Como rotina, em laboratórios que realizam o desenvolvimento e a validação de métodos o mais comum é a realização de ensaios de recuperação, conforme foi realizado neste trabalho para os métodos QuEChERS e SILLME. Outra maneira de se avaliar a

exatidão de um método é pela comparação com outros. Ela consiste na comparação entre resultados obtidos empregando-se o método em desenvolvimento e os resultados conseguidos por um de referência, avaliando o grau de proximidade entre os resultados obtidos pelos dois, ou seja, o grau de exatidão do método testado em relação ao de referência (RIBANI *et al.*, 2004). Para tal, o método QuEChERS padronizado e validado neste trabalho foi considerado como método de referência.

Após a validação do método SILLME padronizado, o mesmo foi submetido à determinação de conservantes em diferentes alimentos processados. De forma a avaliar a exatidão do método, as mesmas amostras foram submetidas ao método QuEChERS validado desenvolvido neste trabalho. Os resultados são apresentados na Tabela 17.

Para a comparação entre os métodos foram selecionados como amostras alimentos processados que já haviam sido inicialmente analisados pelo método QuEChERS. Assim, sabia-se que os conservantes estariam presentes e quais deles em cada amostra, porém, não se conhecia a concentração. Também foi dada preferência a amostras que tivessem mais de um conservante presente, além de buscar variar tanto a composição quanto a consistência, avaliando desde amostras líquidas quanto sólidas e pastosas. Desta forma, foi avaliado o grau de proximidade entre os resultados obtidos pelos dois métodos, assumindo sempre o maior valor em concentração obtido como sendo o valor verdadeiro para o cálculo da concordância em percentual.

As concentrações encontradas para os conservantes por ambos os métodos são similares aquelas encontradas na aplicabilidade do método QuEChERS (Tabelas 12, 13 e 14), não sendo observadas discrepâncias nos resultados em relação ao que já havia sido determinado. Também não foram observados valores que ultrapasassem a concentração máxima permitida, com exceção da concentração de sorbato na amostra de requeijão, cujo limite é 1000 mg kg^{-1} . Neste ensaio, o importante a ser ressaltado é que os valores determinados por ambos os métodos foram similares. As concordâncias entre os resultados ficaram entre 94 e 99% para as amostras avaliadas. Este resultado reafirma a capacidade de ambos os métodos gerarem resultados confiáveis para a determinação de conservantes em alimentos processados com diferentes composições, sendo apropriados para determinações de rotina de conservantes em diferentes alimentos.

Tabela 17. Comparação das concentrações \pm desvio padrão (mg kg^{-1}) de conservantes em diferentes amostras obtidas através dos métodos QuEChERS e SILLME. Cada amostra foi analisada em triplicata por cada método.

Amostras	Benzoato			Sorbato			Metilparabeno		
	QuEChERS	SILLME	C	QuEChERS	SILLME	C	QuEChERS	SILLME	C
Adoçante	423 \pm 2,3	410 \pm 3,6	97%	n.d	n.d	-	448 \pm 3,9	461 \pm 4,3	97%
Refrigerante	92 \pm 6,3	96 \pm 0,4	96%	140 \pm 2,5	144 \pm 2,0	97%	n.d	n.d	-
Suco de fruta	253 \pm 21,0	255 \pm 8,5	99%	146 \pm 1,0	155 \pm 5,2	94%	n.d	n.d	-
Ketchup	808 \pm 32,6	814 \pm 74,7	99%	608 \pm 2,3	634 \pm 59,6	96%	n.d	n.d	-
logurte	n.d	n.d	-	279 \pm 0,5	274 \pm 2,8	98%	n.d	n.d	-
Requeijão	n.d	n.d	-	1150 \pm 4,0	1154 \pm 16,1	100%	n.d	n.d	-
Doce de fruta	751 \pm 10,1	762 \pm 26,5	99%	298 \pm 1,8	302 \pm 3,1	99%	n.d	n.d	-

n.d – não detectado (< LD)

C - concordância

Os métodos também foram comparados em termos de custo por amostra extraída e volume de resíduos gerados, conforme pode ser observado na Tabela 18. Desconsiderando o custo da amostra, que é variável, e o custo da água ultrapura adicionada, chegou-se ao valor de R\$ 4,22 por amostra extraída pelo método QuEChERS. Considerando todos os reagentes utilizados, são gerados aproximadamente 26 g de resíduos para cada amostra extraída. Para o método empregando a SILLME, o custo por amostra é 2,6 vezes menor, além de gerar aproximadamente 3,25 vezes menos resíduos que o método QuEChERS. Por esta razão, considerando a escolha de um método para aplicação em rotina, o método empregando a SILLME é mais vantajoso, uma vez que oferece capacidade de extração similar ao método QuEChERS, porém, com menor custo e gerando menos resíduos.

Tabela 18. Comparação de custos e volume de resíduos gerados entre o QuEChERS e a SILLME

Propriedades	QuEChERS		SILLME	
	Massa/volume	Custo (R\$)	Massa/volume	Custo (R\$)
Massa de amostra	1,0 g	n.d	0,5 g	n.d
Água ultrapura	10 mL	n.d	4,5 mL*	n.d
Volume de MeCN	10 mL	0,83	1,0 mL	0,08
Massa de MgSO ₄	4 g	3,04	2 g	1,52
Massa de NaCl	1 g	0,35	-	-
Total	~ 26 g	4,22	~8 g	1,60

n.d – não determinado

* - solução tampão acetato pH 4,2

5.4. Comparação dos métodos desenvolvidos com os métodos oficiais para determinação de conservantes em alimentos

Uma característica em comum entre os métodos QuEChERS e SILLME desenvolvidos é a versatilidade. Ambos comprovaram ser adequados para a determinação de conservantes em diferentes alimentos processados,

independentemente das características da matriz ao qual são aplicados. Desde amostras mais simples, como sucos e refrigerantes, compostos principalmente de água, açúcares e corantes, até amostras mais complexas, com elevados teores de gordura, como iogurtes, requeijões, margarinas; amostras com elevados teores de pigmentos, como os molhos e condimentos avaliados; diferentes texturas, desde amostras líquidas às sólidas e pastosas; independentemente das características da matriz ao quais os métodos foram submetidos (Tabela A1) os resultados obtidos foram satisfatórios, em termos de exatidão (77 – 109%) e precisão ($\leq 20\%$).

O *Codex Alimentarius* não sugere nenhum método geral para alimentos processados, apenas métodos específicos (CODEX, 1999). Para sucos de fruta e néctares, métodos como o NMKL124 do Comitê Nórdico de Análise de Alimentos (NMKL, 2007), que prevê a determinação cromatográfica de benzoato, sorbato e metil, etil e propilparabeno, extraídos com uma mistura de metanol e água. Após filtração e separação em coluna de C18, os conservantes são detectados por UV a 235 nm. Entretanto, para este método, são necessários dois conjuntos de fase móvel: um para a determinação do sorbato e benzoato e outro para a determinação dos parabenos, além do fato deste método não abranger outros alimentos em seu escopo.

Métodos da ISO, como o 5518 para a determinação de benzoato em frutas vegetais e produtos derivados (ISO, 2007), o 6560, também para determinação de benzoato, porém em concentrações maiores (ISO, 1983), e o 5519, para a determinação de sorbato (ISO, 2008a), também são sugeridos pelo *Codex Alimentarius*. Porém, todos apresentam como desvantagem a falta de seletividade da determinação espectrofotométrica e a necessidade de realização de múltiplas análises para a determinação dos diferentes conservantes. Outros métodos da ISO são sugeridos pelo *Codex Alimentarius*, como o 22855 para a determinação de sorbato e benzoato em frutas e produtos de origem vegetal (ISO, 2008c) e o 9231 para determinação dos mesmos conservantes em leite e derivados (ISO, 2008b), ambos empregando HPLC. Porém o baixo escopo dos métodos sugeridos pela ISO pode ser um problema para análises de rotina de diferentes alimentos.

Quando os métodos desenvolvidos neste trabalho são comparados aos métodos oficiais propostos pela AOAC, as vantagens são evidentes. O método

960.38 da AOAC para determinação de benzoato possui a desvantagem da baixa seletividade da determinação espectrofotométrica, além de seu escopo incluir apenas bebidas e alimentos não sólidos (AOAC, 1964). O método 983.16 da AOAC para determinação de benzoato e sorbato em alimentos sólidos envolve uma etapa de extração com éter em solução de hidróxido de sódio e diclorometano, conversão para trimetilsilil ésteres e análise por GC-FID. Além de ser um método demorado, uma das principais desvantagens é o uso de solvente clorado, sendo este um método danoso tanto ao meio ambiente quanto ao analista (AOAC, 1983).

Traçando uma comparação entre alguns métodos oficiais com os métodos desenvolvidos neste trabalho (Tabela 19), podemos observar que é possível pelos métodos QuEChERS e SILLME realizar a determinação de conservantes em alimentos com as vantagens de estar empregando métodos mais rápidos, que utilizam menores volumes de reagentes, conseqüentemente geram menos resíduos e possuem menor custo, mantendo a eficiência de extração dentro dos limites aceitáveis.

Tabela 19. Comparação entre os métodos de referência para determinação de conservantes em alimentos com os métodos propostos neste trabalho

Amostras	Massa/Volume de amostra	Solvente de extração	Técnica de extração	Tempo de extração	Técnica de determinação	Método
Sucos de frutas e néctares	20 mL	Éter dietílico – 150 mL	LLE	~ 3 horas	Espectrofotometria UV-Vis	ISO 5518 e 6560
Leite e derivados	3 – 20 g	NaOH 0,1 mol L ⁻¹ – 25 mL Metanol - ~75 mL	LLE	~2 horas	HPLC-UV	ISO 9231
Suco de frutas e vegetais	5 – 10 mL	Tampão acetato de amônio e metanol (60:40, v:v) – 100 mL	LLE	~30 minutos	HPLC-UV	ISO 22855
Diferentes alimentos processados	1,0 g	MeCN - 10 mL	QuEChERS	10 minutos	HPLC-UV	Métodos propostos
	0,5 g	MeCN - 1 mL	SILLME	12 minutos	HPLC-UV	

5.5. Comparação dos métodos desenvolvidos com métodos disponíveis na literatura para determinação de conservantes em alimentos

Diferentes trabalhos na literatura propõem métodos para superar as limitações práticas dos métodos oficiais. Porém, de maneira geral, a maioria deles é aplicada para uma classe específica de alimentos, sendo necessário propor diferentes abordagens de acordo com as características das amostras. Por exemplo, para amostras líquidas, como bebidas não alcoólicas, geralmente apenas um pré-tratamento é necessário, como centrifugação, filtração e desgaseificação antes da diluição da amostra para determinação por HPLC (TFOUNI e TOLEDO, 2002a; GÖREN *et al.*, 2015). Porém, quando é necessário determinar em amostras sólidas ou mesmo em amostras líquidas mais complexas, maior tratamento da amostra é necessário. Deste ponto de vista, o desenvolvimento de métodos robustos, capazes de serem aplicados a diferentes amostras, independente das características da matriz, se torna interessante, aumentando a capacidade do laboratório em fornecer resultados confiáveis e rápidos para qualquer amostra que seja requisitado.

Técnicas inovadoras, como a DLLME, têm sido propostas para a determinação de conservantes. Entretanto, embora esta técnica tenha como vantagem o uso de pequenos volumes de solvente e a substituição de solventes clorados por solventes menos tóxicos, sua aplicabilidade é restrita a amostras líquidas ou amostras sólidas após um pré-tratamento apropriado, como refrigerantes, leite, ketchup, pão (JAVANMARDI *et al.*, 2015), iogurte (KAMANKESH *et al.*, 2013), derivados de leite (ABEDI *et al.*, 2014), além da dificuldade na remoção da gota orgânica. Métodos baseados na LLE são aplicáveis tanto a amostras líquidas quanto sólidas, porém, são geralmente tediosos, demandam grandes quantidades de amostra e solventes, além de serem realizados em diferentes etapas, tornando-os difíceis de serem aplicados em rotina. Métodos envolvendo a SPE requerem aparatos específicos, além do elevado custo dos cartuchos de extração.

Na Tabela 20, os métodos propostos neste trabalho são comparados com outros métodos de preparo de amostra que vem sendo empregados para a determinação de conservantes em alimentos. Pode ser observado que os métodos propostos apresentam LQs, exatidão e precisão semelhante ao que vem sendo

encontrado por outros trabalhos. Além disso, a maioria destes procedimentos envolvem etapas de pré-tratamento das amostras para adequá-las aos métodos de extração, além de realizarem evaporação e filtração dos extratos ao final do procedimento, aumentando o número de etapas, conseqüentemente, o custo e as fontes de possíveis erros. Nos métodos desenvolvidos neste trabalho, as amostras são apenas homogeneizadas previamente e os extratos finais são diretamente analisados após diluição na composição da fase móvel. Além disso, é utilizado um equipamento com custo inferior aos equipamentos com detecção por espectrometria de massas.

Os métodos propostos baseados no QuEChERS e SILLME utilizam equipamentos de laboratório comum, como agitadores tipo vórtex e centrífugas, podendo ser executados por qualquer analista com um rápido treinamento. Cada amostra não leva mais do que 15 minutos para estar pronta para análise por cada método. Quando comparados com os demais mencionados e os oficiais, ambos os métodos desenvolvidos neste trabalho comprovaram ser boas opções para a determinação de conservantes em diferentes amostras de alimentos processados.

Tabela 20. Comparação entre os métodos propostos neste trabalho com outros métodos empregados para determinação de conservantes em alimentos

Técnica de extração	Amostras	Massa/ Volume de amostra	Solvente de extração	Tempo de extração	Exatidão	Precisão	LOQ mg kg ⁻¹	Técnica de determinação	Referências
LLE	Molho shoyu	1,0 g	Éter dietílico 5 mL	~30 minutos	96 – 104%	≤ 3%	0,1 - 0,2	HPLC-UV	(DING <i>et al.</i> , 2015)
DLLME	Derivados de leite	1,0 – 2,0 g	1-octanol 60 µL	~30 minutos	88 - 104%	≤ 6%	0,48 - 0,50	GC-FID	(ABEDI <i>et al.</i> , 2014)
MSPD	Frutos do mar	0,5 g	MeCN 12 mL	~60 minutos	93 – 112%	≤ 8%	0,0002-0,001	GC-MS	(DJATMIKA <i>et al.</i> , 2016)
QuEChERS	Derivados de leite	4 mL	MeCN 4 mL	~10 minutos	81-112%	≤ 9%	0,03 – 0,07	LC-MS	(SEFIDI <i>et al.</i> , 2018)
SALLE	Sucos de frutas	3 mL	Acetona:etanol (1:1, v:v) 0,5 mL	~100 minutos	85 – 122%	≤ 9%	5,01 – 5,14	UHPLC-UV	(TIGHRINE <i>et al.</i> , 2019)
QuEChERS	Diferentes alimentos processados	1,0 g	MeCN 10 mL	10 minutos	77 – 109%	≤ 20%	0,13 – 0,33	HPLC-UV	Métodos propostos
SILLME		0,5 g	MeCN 1 mL	12 minutos	80 – 103%	≤ 11%	0,03 - 0,07		

6. CONCLUSÕES

Os métodos padronizados neste estudo, empregando QuEChERS e SILLME para a determinação de conservantes em alimentos apresentaram valores dentro dos sugeridos pelos guias de validação para todas as figuras de mérito avaliadas, demonstrando exatidão (77 - 109%), precisão ($\leq 20\%$) e incerteza das medições ($\leq 39\%$) aceitáveis, além de LOQs menores que 1 mg kg^{-1} , similares a outros trabalhos na literatura e apropriados para os objetivos propostos.

Os métodos apresentam as vantagens de serem procedimentos modernos e dinâmicos, que podem ser aplicados a qualquer laboratório, devido à simplificação das etapas lentas e trabalhosas que geralmente são associadas aos métodos oficiais para determinação de conservantes em alimentos. Ambos os métodos são simples e rápidos, com número reduzido de etapas analíticas, o que minimiza erros, além de serem baratos e ambientalmente corretos, devido ao baixo consumo de reagentes e solventes, exposição mínima do analista e menor geração de resíduos.

O trabalho desenvolvido apresenta caráter inovador, contribuindo no desenvolvimento de métodos analíticos validados empregando técnicas modernas de extração, que podem constituir-se em alternativas aos métodos oficiais. Destaca-se também a vantagem dos métodos propostos serem aplicados para diferentes matrizes, simplificando a rotina analítica.

Comparado com os métodos propostos na literatura para determinação de conservantes em alimentos, os métodos desenvolvidos neste trabalho apresentam a vantagem de não necessitarem de uma etapa prévia de tratamento da amostra para extração, além do escopo abrangente para diversos alimentos. Também, ao final da etapa de extração, não é necessário realizar evaporação, o que reduz o número de etapas, conseqüentemente, o custo e o tempo do método.

Durante a aplicabilidade dos métodos, foi possível realizar a determinação em todas as amostras de alimentos que mencionavam o uso de conservantes em seus rótulos, em concentrações de até 2040 mg kg^{-1} para o benzoato, 3185 mg kg^{-1} para o sorbato e 452 mg kg^{-1} para o metilparabeno, enquanto que o etilparabeno e o propilparabeno não foram detectados nas amostras. De maneira geral, a

concentração de conservantes nas amostras não ultrapassou a concentração máxima permitida, apenas em alguns casos.

Os métodos QuEChERS e SILLME foram comparados na aplicabilidade e foi demonstrado que ambos os métodos fornecem resultados satisfatórios quando submetidos a determinação de conservantes em alimentos, com concordância entre os resultados entre 94 e 99%.

Quanto a aplicabilidade com o método QuEChERS foi possível identificar as principais fontes de conservantes à população e estimar a ingestão diária dos mesmos, onde foi observado que o benzoato é o que possui dados mais alarmantes, com EDI de 25% da IDA, quando considerado o consumo médio. No caso de consumidores extremos, este dado pode ser subestimado.

Enfim, conclui-se que os métodos de extração empregando QuEChERS e SILLME em conjunto com a determinação por HPLC-UV são ferramentas que podem ser utilizadas em rotina para a quantificação de conservantes em diferentes amostras de alimentos em substituição aos métodos oficiais de análise, visto que todos os parâmetros de validação encontram-se dentro dos limites exigidos pelos guias de validação de métodos, com as vantagens de serem métodos rápidos, baratos e seguros, que seguem os princípios da Química Analítica Verde, atendendo satisfatoriamente os objetivos propostos para este trabalho.

7. TRATAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS

As atividades de um laboratório envolvem a geração de grandes quantidades de resíduos, tanto líquidos quanto sólidos, provenientes dos ensaios analíticos. Estes devem ser tratados e descartados de forma adequada.

Neste trabalho, todos os resíduos gerados foram recolhidos, separados em frascos rotulados e armazenados adequadamente, para recolhimento pela instituição para o tratamento de resíduos.

8.SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Avaliar os métodos propostos na determinação de outros aditivos alimentares, como corantes, edulcorantes e adoçantes artificiais em amostras de alimentos, tal como estimar a sua ingestão diária.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEDI, A.-S. et al. Simultaneous determination of sorbic and benzoic acids in milk products using an optimised microextraction technique followed by gas chromatography. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 31, n. 1, p. 21-28, 2014.

AHMED, S.; MAHMOUD, A. M. A novel salting-out assisted extraction coupled with HPLC- fluorescence detection for trace determination of vitamin K homologues in human plasma. **Talanta**, v. 144, p. 480-487, 2015.

AKRAM, S. et al. Salting-out-assisted liquid-liquid extraction and reverse-phase high-performance liquid chromatographic monitoring of thiacloprid in fruits and vegetables. **Separation Science and Technology**, v. 53, n. 10, p. 1563-1571, 2017.

ALSHANA, U.; ERTAŞ, N.; GÖĞER, N. G. Determination of parabens in human milk and other food samples by capillary electrophoresis after dispersive liquid-liquid microextraction with back-extraction. **Food Chemistry**, v. 181, p. 1-8, 2015.

ALSHISHANI, A.; SALHIMI, S. M.; SAAD, B. Salting-out assisted liquid-liquid extraction coupled with hydrophilic interaction chromatography for the determination of biguanides in biological and environmental samples. **Journal of Chromatography B**, v. 1073, p. 51-59, 2018.

AMIRPOUR, M. et al. Sodium benzoate and potassium sorbate preservatives in food stuffs in Iran. **Food Additives & Contaminants: Part B**, v. 8, n. 2, p. 142-148, 2015.

AMIT, S. K. et al. A review on mechanisms and commercial aspects of food preservation and processing. **Agriculture & Food Security**, v. 6, n. 1, p. 1-22, 2017.

ANASTASSIADES, M. et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, p. 412-431, 2003.

ANASTASSIADES, M. et al. Recent developments in QuEChERS methodology for pesticide multiresidue analysis. **Pesticide chemistry: crop protection, public health, environmental safety**. Wiley-VCH, Weinheim, 2007.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N° 166 - Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. 2017.

ANVISA Aditivos Alimentares e Coadjuvantes de Tecnologia. 2019. Disponível em < <http://portal.anvisa.gov.br/alimentos/aditivos-alimentares> >. Acesso em 2 de Julho de 2019.

AOAC. Official Method 960.38 Benzoic Acid in Non-Solid Food and Beverages Spectrophotometric Method First Action 1960 Final Action 1964. **Journal of AOAC International**, 1964.

AOAC. Official Method 983.16 Benzoic acid and sorbic acid in food. **Journal of AOAC International**, 1983.

AOAC. Official Method 2007.01: Pesticides residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate. **Journal of AOAC International**, 2007.

ARIAS, J. L. D. O. et al. Chitosan from shrimp shells: A renewable sorbent applied to the clean-up step of the QuEChERS method in order to determine multi-residues of veterinary drugs in different types of milk. **Food Chemistry**, v. 240, p. 1243-1253, 2018.

BEMRAH, N.; LEBLANC, J.-C.; VOLATIER, J.-L. Assessment of dietary exposure in the French population to 13 selected food colours, preservatives, antioxidants, stabilizers, emulsifiers and sweeteners. **Food Additives and Contaminants: Part B**, v. 1, n. 1, p. 2-14, 2008.

BILAU, M. et al. Intake assessment for benzoates in different subgroups of the Flemish population. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 717-723, 2008.

BŁĘDZKA, D.; GROMADZIŃSKA, J.; WAŚOWICZ, W. Parabens. From environmental studies to human health. **Environment International**, v. 67, p. 27-42, 2014.

BOSCH OJEDA, C.; SÁNCHEZ ROJAS, F. Vortex-Assisted Liquid-Liquid Microextraction (VALLME): Applications. **Chromatographia**, v. 77, n. 11-12, p. 745-754, 2014.

BRASIL. Resolução nº 04/88, de 24 de Novembro de 1988, ABIA - Compêndio da Legislação de Alimentos - Atos do Ministério da Saúde. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 1988.

BRASIL. Portaria nº 540-SVS/MS, de 27 de outubro de 1997. Aprova do Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares-definições, classificação e emprego. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 1997.

BRASIL. Resolução RDC nº 8, de 20 de fevereiro de 2008 - Proíbe o uso dos aditivos Propilparabeno e Propilparabeno de Sódio em alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 2008.

BRASIL. **Manual de métodos oficiais para análise de alimentos de origem animal. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária.** Brasília: 2017. 140p.

BRIGHENTI, V. et al. Development of a new method for the analysis of cannabinoids in honey by means of high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionisation-tandem mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1597, p. 179-186, 2019.

BROWN, A. C. **Understanding food: principles and preparation.** Cengage learning, 2018. ISBN 1337672351.

CAMARGO, M. C. R.; TOLEDO, M. C. F.; FARAH, H. G. Caffeine daily intake from dietary sources in Brazil. **Food Additives & Contaminants**, v. 16, n. 2, p. 79-87, 1999.

CAROCHO, M.; MORALES, P.; FERREIRA, I. C. F. R. Natural food additives: Quo vadis? **Trends in Food Science & Technology**, v. 45, n. 2, p. 284-295, 2015.

CARREIRA, F. C. **Determinação de parabenos em antitranspirantes empregando voltametria sob eletrodo de diamante e cromatografia líquida de alta eficiência.** 2008. 114 p. Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

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

CHEN, C.-W. et al. Determination of parabens using two microextraction methods coupled with capillary liquid chromatography-UV detection. **Food Chemistry**, v. 241, p. 411-418, 2018.

CHEN, J.; WEI, Z.; CAO, X.-Y. QuEChERS Pretreatment Combined with Ultra-performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry for the Determination of Four Veterinary Drug Residues in Marine Products. **Food Analytical Methods**, v. 12, n. 5, p. 1055-1066, 2019.

CHEN, X.-H. et al. Application of dispersive solid-phase extraction and ultra-fast liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry in food additive residue analysis of red wine. **Journal of Chromatography A**, v. 1263, p. 34-42, 2012.

CHEN, Y. et al. Modified QuEChERS Combination with Magnetic Solid-Phase Extraction for the Determination of 16 Preservatives by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 10, n. 3, p. 587-595, 2016.

CHERKASHINA, K. et al. An automated salting-out assisted liquid-liquid microextraction approach using 1-octylamine: On-line separation of tetracycline in urine samples followed by HPLC-UV determination. **Talanta**, v. 184, p. 122-127, 2018.

CHIPLEY, J. R. Sodium Benzoate and Benzoic Acid. In: DAVIDSON P. M.;SOFOS J. N., *et al* (Ed.). **Antimicrobials in Food**: CRC press, 2005. cap. 2, p.11-38. ISBN 1420028731.

CODEX. Recommended methods of analysis and sampling. Adopted in 1999. Revision 2018. **Codex stan 234-1999**, p. 1-78, 1999.

CODEX. General standard for food additives. Adopted in 1995. Revision 2017. **Codex stan 192-1995**, p. 1-448, 2017.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Editora da Unicamp, 2006. 456 ISBN 9788526807044.

COSTA, F. P.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in canned and fresh peach. **Food Chemistry**, v. 165, p. 587-593, 2014.

COSTA, J. C. D. **Validação de um Método de Cromatografia de Alta Eficiência para Determinação de Conservantes em Géneros Alimentícios**. 2015. 127 Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, Lisboa.

CRESSEY, P.; JONES, S. Levels of preservatives (sulfite, sorbate and benzoate) in New Zealand foods and estimated dietary exposure. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 26, n. 5, p. 604-613, 2009.

DARBRE, P. D. et al. Concentrations of parabens in human breast tumours. **Journal of Applied Toxicology**, v. 24, n. 1, p. 5-13, 2004.

DAVIDSON, P. M. Parabens. In: DAVIDSON P. M.;SOFOS J. N., *et al* (Ed.). **Antimicrobials in Food**: CRC press, 2005. cap. 9, p.291-301. ISBN 1420028731.

DING, M. et al. Simultaneous determination of seven preservatives in food by dispersive liquid-liquid microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 269, p. 187-192, 2018.

DING, M. et al. An environment-friendly procedure for the high performance liquid chromatography determination of benzoic acid and sorbic acid in soy sauce. **Food Chemistry**, v. 183, p. 26-29, 2015.

DJATMIKA, R. et al. Determination of paraben preservatives in seafood using matrix solid-phase dispersion and on-line acetylation gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 1036-1037, p. 93-99, 2016.

DU, D. et al. Salting-out induced liquid-liquid microextraction based on the system of acetonitrile/magnesium sulfate for trace-level quantitative analysis of

fluoroquinolones in water, food and biological matrices by high-performance liquid chromatography with a fluorescence detector. **Analytical Methods**, v. 6, n. 17, p. 6973-6980, 2014.

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, 2019.

ECONOMOU, A. et al. Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 31, p. 5856-5867, 2009.

ELISSON, S. L. R.; WILLIAMS, A. **Eurachem/CITAC guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, third ed., United Kingdom.** 2012.

ESCARRONE, A. L. V. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons in rice grain dried by different processes: Evaluation of a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction method. **Food Chemistry**, v. 146, p. 597-602, 2014.

FDA, U. Guidelines for the Validation of Chemical Methods for the FDA FVM Program. 2015.

FUSELLI, F. et al. Multi-detection of preservatives in cheeses by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 906, p. 9-18, 2012.

GAŁUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z.; NAMIEŚNIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 50, p. 78-84, 2013.

GÖREN, A. C. et al. HPLC and LC-MS/MS methods for determination of sodium benzoate and potassium sorbate in food and beverages: Performances of local accredited laboratories via proficiency tests in Turkey. **Food Chemistry**, v. 175, p. 273-279, 2015.

GRECCO, C. et al. Determination of Parabens in Breast Milk Samples by Dispersive Liquid-Liquid Microextraction (DLLME) and Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 1, p. 48-59, 2018.

GURE, A. et al. Salting-out assisted liquid-liquid extraction combined with capillary HPLC for the determination of sulfonylurea herbicides in environmental water and banana juice samples. **Talanta**, v. 127, p. 51-58, 2014.

HAN, C. et al. Determination of four paraben-type preservatives and three benzophenone-type ultraviolet light filters in seafoods by LC-QqLIT-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 194, p. 1199-1207, 2016.

HE, J. et al. Preparation and selective recognition of a novel solid-phase microextraction fiber combined with molecularly imprinted polymers for the extraction of parabens in soy sample. **Journal of Separation Science**, v. 35, n. 2, p. 308-314, 2012.

HIDALGO-RUIZ, J. L. et al. Determination of mycotoxins in nuts by ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Looking for a representative matrix. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 82, p. 103228, 2019.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de orçamentos familiares 2008–2009: Análise do consumo alimentar pessoal no Brasil. **Rio de Janeiro: IBGE**, 2011.

INMETRO. Brasília: INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. DOQ-CGCRE-008: Orientações sobre validação de métodos analíticos., 2018. 28.

ISO. 6560:1983 - Fruit and vegetable products - Determination of benzoic acid content (benzoic acid contents greater than 200 mg per litre or per kilogram) -- Molecular absorption spectrometric method. **International Organization for Standardization**, 1983.

ISO. 5518:2007 - Fruits, vegetables and derived products - Determination of benzoic acid content -- Spectrophotometric method. **International Organization for Standardization**, 2007.

ISO. 5519:2007 - Fruits, vegetables and derived products -- Determination of sorbic acid content. **International Organization for Standardization**, 2008a.

ISO. 9231:2008 - Milk and milk products - Determination of the benzoic and sorbic acid contents. **International Organization for Standardization**, 2008b.

ISO. 22855:2008 - Fruit and vegetable products - Determination of benzoic acid and sorbic acid concentrations -- High performance liquid chromatography method. **International Organization for Standardization**, 2008c.

JAIN, R. et al. Simultaneous derivatisation and preconcentration of parabens in food and other matrices by isobutyl chloroformate and dispersive liquid–liquid microextraction followed by gas chromatographic analysis. **Food Chemistry**, v. 141, n. 1, p. 436-443, 2013.

JAVANMARDI, F. et al. Benzoic and sorbic acid in soft drink, milk, ketchup sauce and bread by dispersive liquid–liquid microextraction coupled with HPLC. **Food Additives & Contaminants: Part B**, v. 8, n. 1, p. 32-39, 2015/01/02 2015.

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. New York: Chapman & Hall, 1996.

JECFA. The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Toxicological evaluation of certain food additives with a review of general principles and of

specifications. 17th Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. World Health Organization Technical Report Series no. 539; Switzerland: FAO and WHO. 1974.

JIA, W. et al. Analysis of additives in dairy products by liquid chromatography coupled to quadrupole-orbitrap mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1336, p. 67-75, 2014.

KAMANESH, M. et al. Dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography for determination of benzoate and sorbate in yogurt drinks and method optimization by central composite design. **Talanta**, v. 109, p. 46-51, 2013.

KOLTSAKIDOU, A.; ZACHARIS, C. K.; FYTIANOS, K. A validated liquid chromatographic method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in honey after homogeneous liquid-liquid extraction using hydrophilic acetonitrile and sodium chloride as mass separating agent. **Journal of Chromatography A**, v. 1377, p. 46-54, 2015.

KUPSKI, L.; BADIALE-FURLONG, E. Principal components analysis: An innovative approach to establish interferences in ochratoxin A detection. **Food Chemistry**, v. 177, p. 354-360, 2015.

LAZAREVIĆ, K.; STOJANOVIĆ, D.; RANČIĆ, N. Estimated Daily Intake of Benzoic Acid through Food Additives in Adult Population of South East Serbia. **Central European Journal of Public Health**, v. 19, n. 4, p. 228-231, 2011.

LEHOTAY, S. J. Determination of Pesticides Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate: Collaborative Study. **Journal of AOAC International**, v. 90, p. 485-520, 2007.

LETH, T.; CHRISTENSEN, T.; LARSEN, I. K. Estimated intake of benzoic and sorbic acids in Denmark. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 27, n. 6, p. 783-792, 2010.

LIAO, C.; CHEN, L.; KANNAN, K. Occurrence of parabens in foodstuffs from China and its implications for human dietary exposure. **Environment International**, v. 57-58, p. 68-74, 2013a.

LIAO, C.; LIU, F.; KANNAN, K. Occurrence of and Dietary Exposure to Parabens in Foodstuffs from the United States. **Environmental Science & Technology**, v. 47, n. 8, p. 3918-3925, 2013b.

LIN, F. et al. Sensitive determination of organic acid preservatives in juices and soft drinks treated by monolith-based stir cake sorptive extraction and liquid chromatography analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 6, p. 2077-2081, 2013.

LING, M.-P. et al. Dietary Exposure Estimates for the Food Preservatives Benzoic Acid and Sorbic Acid in the Total Diet in Taiwan. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 7, p. 2074-2082, 2015.

LÜCK, E.; JAGER, M. **Conservación química de los alimentos: características, usos, efectos**. Ed. Acribia, 2000. ISBN 9788420008981.

MA, J. et al. Comparison of Six Sample Preparation Methods for Analysis of Food Additives in Milk Powder. **Food Analytical Methods**, v. 7, n. 6, p. 1345-1352, 2013.

MACHADO, R. M. D. et al. Presença dos ácidos benzóico e sórbico em vinhos e sidras produzidos no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 847-850, 2007.

MAGIERA, S.; KOLANOWSKA, A.; BARANOWSKI, J. Salting-out assisted extraction method coupled with hydrophilic interaction liquid chromatography for determination of selected β -blockers and their metabolites in human urine. **Journal of Chromatography B**, v. 1022, p. 93-101, 2016.

MAGIERA, S.; KWIETNIOWSKA, E. Fast, simple and efficient salting-out assisted liquid-liquid extraction of naringenin from fruit juice samples prior to their enantioselective determination by liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 211, p. 227-234, 2016.

MARIÑO-REPIZO, L. et al. A simple, rapid and novel method based on salting-out assisted liquid-liquid extraction for ochratoxin A determination in beer samples prior to ultra-high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 35, n. 8, p. 1622-1632, 2018.

MARTINS, M. L. et al. Dilution standard addition calibration: A practical calibration strategy for multiresidue organic compounds determination. **Journal of Chromatography A**, v. 1460, p. 84-91, 2016.

MATKOVICH, C. E.; CHRISTIAN, G. D. Salting-out of acetone from water. Basis of a new solvent extraction system. **Analytical Chemistry**, v. 45, n. 11, p. 1915-1921, 1973/09/01 1973.

MATUSZEWSKI, B. K.; CONSTANZER, M. L.; CHAVEZ-ENG, C. M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 13, p. 3019-3030, Jul 2003.

MISCHEK, D.; KRAPPENBAUER-CERMAK, C. Exposure assessment of food preservatives (sulphites, benzoic and sorbic acid) in Austria. **Food Additives & Contaminants: Part A**, p. 1-12, 2011.

MOHAMED, H. M. Green, environment-friendly, analytical tools give insights in pharmaceuticals and cosmetics analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 66, p. 176-192, 2015.

MOLOGNONI, L. et al. A multi-purpose tool for food inspection: Simultaneous determination of various classes of preservatives and biogenic amines in meat and fish products by LC-MS. **Talanta**, v. 178, p. 1053-1066, 2018.

MORENO-GONZÁLEZ, D.; GARCÍA-CAMPAÑA, A. M. Salting-out assisted liquid-liquid extraction coupled to ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of tetracycline residues in infant foods. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1763-1769, 2017.

NETO, A. Problemas com o Formato dos Picos em Cromatografia Líquida – Parte 4. **Scientia Chromatographica**, v. 2, p. 61-67, 2010.

NIU, Z. et al. Salting-out assisted liquid-liquid extraction combined with gas chromatography-mass spectrometry for the determination of pyrethroid insecticides in high salinity and biological samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 143, p. 222-227, 2017.

NMKL. 124: Benzoic acid, sorbic acid and p-hydroxybenzoic acid esters. Liquid chromatographic determination in foods. **Nordic Committee on Food Analysis NMKL**, 2007.

NOCHE, G. G. et al. In situ aqueous derivatization and determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs by salting-out-assisted liquid-liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 37, p. 6240-6247, 2011.

OKTAVIANY, Y.; ANDARWULAN, N.; GIRIWONO, P. E. Exposure Assessments of Benzoate Preservatives in Foods Consumed in Indonesia. **Asian Journal of Chemistry**, v. 30, n. 10, p. 2241-2248, 2018.

OLIVEIRA, L. G. D. et al. Development and validation of a method for the analysis of pyrethroid residues in fish using GC-MS. **Food Chemistry**, v. 297, p. 124944, 2019.

PEÑA-HERRERA, J. M. et al. Development and validation of an analytical method for determination of pharmaceuticals in fish muscle based on QuEChERS extraction and SWATH acquisition using LC-QTOF-MS/MS system. **Talanta**, v. 199, p. 370-379, 2019.

PERESTRELO, R. et al. QuEChERS - Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends. **Analytica Chimica Acta**, v. 1070, p. 1-28, 2019.

PETROVIĆ, J. et al. PAHs in different honeys from Serbia. **Food Additives & Contaminants: Part B**, v. 12, n. 2, p. 116-123, 2019.

PETRUCI, J. F. D. S.; CARDOSO, A. A.; PEREIRA, E. A. Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de benzoato, sorbato, metil e propilparabenos em produtos alimentícios utilizando a eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1177-1181, 2011.

PRESTES, O. D. Método rápido para a determinação simultânea de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em alimentos de origem animal por LC-MS/MS. **Tese de Doutorado, Programa de Pós Graduação em Química - Universidade Federal de Santa Maria**, 2011.

PRESTES, O. D. et al. QuEChERS - Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, p. 1620-1634, 2009.

RASHIDIPOUR, M. et al. Salt-assisted liquid-liquid extraction coupled with reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction for sensitive HPLC determination of paraquat in environmental and food samples. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 13, n. 1, p. 269-276, 2018.

RAZMARA, R. S.; DANESHFAR, A.; SAHRAI, R. Determination of methylene blue and sunset yellow in wastewater and food samples using salting-out assisted liquid-liquid extraction. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 17, n. 3, p. 533-536, 2011.

REZAEI, M. et al. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1116, n. 1-2, p. 1-9, 2006.

REZAEI, M.; YAMINI, Y.; FARAJI, M. Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2342-2357, 2010.

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

RODRIGUES, S. A. et al. Otimização e validação de método empregando QuEChERS modificado e LC-ESI-MS/MS para determinação de agrotóxicos em cebola. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 780-U62, 2011.

ROUTLEDGE, E. J. et al. Some Alkyl Hydroxy Benzoate Preservatives (Parabens) Are Estrogenic. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 153, n. 1, p. 12-19, 1998/11/01 1998.

SAAD, B. et al. Simultaneous determination of preservatives (benzoic acid, sorbic acid, methylparaben and propylparaben) in foodstuffs using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1073, n. 1-2, p. 393-397, 2005.

SAMPAIO, M. R. F. et al. A method for the determination of multiclass pesticides in sugarcane juice employing QuEChERS and LC-ESI-MS/MS. **Analytical Methods**, v. 5, n. 8, p. 2028, 2013.

SANTE. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. SANTE/11813/2017. European Commission, pp. 1–46., 2017.

SEFIDI, Z. et al. Modified QuEChERS-HPLC Method for Determination of Sodium Benzoate and Potassium Sorbate Preservatives in Dairy Products. **Current Analytical Chemistry**, v. 14, n. 6, p. 571-582, 2018.

SERESHTI, H.; KHOSRAVIANI, M.; SADEGH AMINI-FAZL, M. Miniaturized salting-out liquid–liquid extraction in a coupled-syringe system combined with HPLC–UV for extraction and determination of sulfanilamide. **Talanta**, v. 121, p. 199-204, 2014.

SONI, M. G.; CARABIN, I. G.; BURDOCK, G. A. Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 7, p. 985-1015, 2005.

STOPFORTH, J. D.; SOFOS, J. N.; BUSTA, F. F. Sorbic Acid and Sorbates. In: DAVIDSON P. M.; SOFOS J. N., *et al* (Ed.). **Antimicrobials in Food**: CRC press, 2005. cap. 3, p.49-75. ISBN 1420028731.

SUGIURA, J.; NAKAJIMA, M. Simultaneous determination of nine preservatives in food by liquid chromatography with the aid of coagulant in the clean-up process. **Food Additives & Contaminants: Part A**, p. 1-10, 2017.

SZNAJDER-KATARZYŃSKA, K. et al. The perfluoroalkyl substance (PFAS) contamination level in milk and milk products in Poland. **International Dairy Journal**, v. 96, p. 73-84, 2019.

TBCA Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. Universidade de São Paulo (USP). Food Research Center (FoRC). Versão 7.0. São Paulo, 2019. Disponível em < <http://www.fcf.usp.br/tbca> >. Acesso em 22 de setembro de 2019.

TEJADA-CASADO, C. et al. Green and simple analytical method to determine benzimidazoles in milk samples by using salting-out assisted liquid-liquid extraction and capillary liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 1091, p. 46-52, 2018.

TFOUNI, S. A. V. **Estimativa da Ingestão Diária dos Conservadores Ácido Benzoico e Ácido Sórbico no Brasil**. 2000. 126p. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

TFOUNI, S. A. V.; TOLEDO, M. C. F. Determination of benzoic and sorbic acids in Brazilian food. **Food Control**, v. 13, n. 2, p. 117-123, 2002/03/01/ 2002a.

TFOUNI, S. A. V.; TOLEDO, M. C. F. Estimates of the mean per capita daily intake of benzoic and sorbic acids in Brazil. **Food Additives & Contaminants**, v. 19, n. 7, p. 647-654, 2002b.

TIGHRINE, A. et al. Simultaneous extraction and analysis of preservatives and artificial sweeteners in juices by salting out liquid-liquid extraction method prior to ultra-high performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 277, p. 586-594, 2019.

TOMASINI, D. et al. Simultaneous determination of pesticides and 5-hydroxymethylfurfural in honey by the modified QuEChERS method and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 99, p. 380-386, 2012.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F.; RIEDO, C. R. F. Análise quantitativa por cromatografia. **Chemkeys**, 2006.

VALENTE, I. M. et al. Determination of ethyl carbamate in spirits using salting-out assisted liquid-liquid extraction and high performance liquid chromatography with fluorimetric detection. **Analytical Methods**, v. 6, n. 22, p. 9136-9141, 2014.

WHO. World Health Organization. Guidelines for the study of dietary intakes of chemical contaminants. 1985.

WHO. Principles for the safety assessment of food additives and contaminants in food. **Environmental Health Criteria**, v. 70, 1987.

WHO. Benzoic acid and sodium benzoate: concise International chemical assessment document, 26. **WHO: Geneva**, 2000.

WHO. World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations & Joint FAO WHO Expert Committee on Food Additives. Meeting (80th 2015, Rome, Italy). (201). Evaluation of certain food additives and contaminants: eightieth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. World Health Organization. . 2016.

WU, Y. et al. Quantitative analysis of fourteen heterocyclic aromatic amines in bakery products by a modified QuEChERS method coupled to ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). **Food Chemistry**, v. 298, p. 125048, 2019.

XIONG, X. et al. High-throughput salting-out assisted liquid-liquid extraction with acetonitrile for the determination of anandamide in plasma of hemodialysis patients with liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**, v. 29, n. 9, p. 1317-1324, 2015.

YANG, J. et al. Simultaneous Determination of Six Parabens in Foods by Matrix Liquid-Phase Dispersion Extraction Combined with High-Performance Liquid Chromatography. **Food Analytical Methods**, v. 7, n. 8, p. 1693-1702, 2014.

YE, J. et al. Rapid determination of parabens in seafood sauces by high-performance liquid chromatography: A practical comparison of core-shell particles

and sub-2 μm fully porous particles. **Journal of Separation Science**, v. 38, n. 23, p. 3992-3999, 2015.

YIN, Q.; ZHU, Y.; YANG, Y. Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Followed by Magnetic Solid-Phase Extraction for Determination of Four Parabens in Beverage Samples by Ultra-performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 11, n. 3, p. 797-807, 2017.

ZAMANI MAZDEH, F. et al. Sodium benzoate and potassium sorbate preservatives in Iranian doogh. **Food Additives & Contaminants: Part B**, v. 7, n. 2, p. 115-119, 2014.

ZHANG, C. et al. Determination of polybrominated diphenyl ethers in fish tissue using gas chromatography-isotope dilution tandem inductively coupled plasma mass spectrometry with a mass-shift mode. **Analytica Chimica Acta**, v. 1075, p. 38-48, 2019.

ZHANG, J. et al. High-throughput salting-out assisted liquid/liquid extraction with acetonitrile for the simultaneous determination of simvastatin and simvastatin acid in human plasma with liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 661, n. 2, p. 167-172, 2010.

ZHAO, Y.-G. et al. Analysis of nine food additives in wine by dispersive solid-phase extraction and reversed-phase high performance liquid chromatography. **Food Research International**, v. 52, n. 1, p. 350-358, 2013.

ZHOU, J. et al. Contamination status of bisphenol A and its analogues (bisphenol S, F and B) in foodstuffs and the implications for dietary exposure on adult residents in Zhejiang Province. **Food Chemistry**, v. 294, p. 160-170, 2019.

10. PRODUÇÃO CIENTÍFICA NO PERÍODO DE DOUTORADO

Março de 2016 a setembro de 2019

ARTIGOS

ARIAS, J.L.O.; ROCHA, C. B.; SANTOS, A. L. Q. S.; MARUBE, L. C. ; KUPSKI, L. ; CALDAS, S. S. ; PRIMEL, E. G. Fast and simple method of simultaneous preservative determination in different processed foods by QuEChERS and HPLC-UV: method development, survey and estimate of daily intake. **FOOD CHEMISTRY**, p. 112-119, 2019.

CALDAS, S. S.; **ARIAS, J. L. O.**; ROMBALDI, C.; MELLO, L. L.; CERQUEIRA, M. B. R.; MARTINS, A. F. ; PRIMEL, E. G. Occurrence of Pesticides and PPCPs in Surface and Drinking Water in Southern Brazil: Data on 4-Year Monitoring. **JOURNAL OF THE BRAZILIAN CHEMICAL SOCIETY**, v. 30, p. 71-80, 2019.

ARIAS, J.L.O.; SCHNEIDER, A.; ANDRADE, J. A. B.; VIEIRA, A. A.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. Chitosan from shrimp shells: a renewable sorbent applied to the clean-up step of the QuEChERS method in order to determine multi-residues of veterinary drugs in different types of milk. **FOOD CHEMISTRY**, v. 240, p. 1243-1253, 2018.

VIEIRA, A. A.; CALDAS, S. S.; ESCARRONE, A. L. V.; **ARIAS, J.L.O.** ; PRIMEL, E. G. Environmentally friendly procedure based on VA-MSPD for the determination of booster biocides in fish tissue. **FOOD CHEMISTRY**, v. 242, p. 475-480, 2018.

VIEIRA, M. G.; STEINKE, G. ; **ARIAS, J.L.O.**; PRIMEL, E. G.; CABRERA, L. C. Evaluation of Pesticide Contamination in the Water Sources of Southwest Parana Cities. **REVISTA VIRTUAL DE QUÍMICA**, v. 9, p. 1800-1812, 2017.

ARIAS, J.L.O.; SCHNEIDER, A. ; ANDRADE, J. A. B. ; VIEIRA, A. A. ; GEHRKE, V. R. ; CAMARGO, E. R. ; CALDAS, S. S. ; PRIMEL, E. G. . Evaluation of Dilute-and-shoot and Solid-phase Extraction Methods for the Determination of S-metolachlor

and Metolachlor-OA in Runoff Water Samples by Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry. **ANALYTICAL METHODS**, v. 9, p. 5777-5783, 2017.

ANDRADE, J. A. B.; CALDAS, S. S.; **ARIAS, J. L. O.** ; CASTRO, I. B.; FILLMAN, G.; PRIMEL, E. G. Antifouling booster biocides in coastal waters of Panama: First appraisal in one of the busiest shipping zones. **MARINE POLLUTION BULETIN**, v. 112, p. 415-419, 2016.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

2018 – XVII Mostra da Produção Universitária – XVII MPU. Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Rio Grande, Brasil

2018 – 19º Encontro Nacional de Química Analítica – ENQA. Sociedade Brasileira de Química – SBQ, Caldas Novas, Brasil

2017 – IV Fórum Acadêmico Integrado de Química – IV FAIQ. Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande, Brasil

2016 – 18º Encontro Nacional de Química Analítica – ENQA. Sociedade Brasileira de Química – SBQ, Florianópolis, Brasil

2016 – XXIII Encontro de Química da Região Sul – XXIII SBQ-Sul. Sociedade Brasileira de Química – SBQ, Santa Maria, Brasil

TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS

ARIAS, J.L.O.; ROCHA, C. B.; SANTOS, A. L. Q. S.; MARUBE, L. C.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. DETERMINAÇÃO DE CONSERVANTES EM ALIMENTOS PROCESSADOS EMPREGANDO QUECHERS E HPLC-UV. In: 19º ENQA - Encontro Nacional de Química Analítica, 2018, Caldas Novas.

ARIAS, J.L.O.; ROCHA, C. B.; SANTOS, A. L. Q. S.; MARUBE, L. C.; KUPSKI, L.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. ESTIMATIVA DA INGESTÃO DIÁRIA DE CONSERVANTES ATRAVÉS DE ALIMENTOS PROCESSADOS

COMERCIALIZADOS NO BRASIL. In: 19º ENQA - Encontro Nacional de Química Analítica, 2018, Caldas Novas.

SANTANA, T. V.; **ARIAS, J.L.O.**; ROCHA, C. B.; SILVA, L. C.; MALINOWSKI, M. H. M.; PRIMEL, E. G.; SOARES, B. M. AVALIAÇÃO DA MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA COM SOLIDIFICAÇÃO DA GOTA ORGÂNICA FLUTUANTE PARA EXTRAÇÃO E PRÉCONCENTRAÇÃO DE CHUMBO EM AMOSTRAS DE SUÇO. In: 19º ENQA - Encontro Nacional de Química Analítica, 2018, Caldas Novas.

GONZALEZ, J. O. ; VOLPATO, D. ; CHIARELI, L. C. S. ; **ARIAS, J.L.O.**; MARUBE, L. C.; PRIMEL, E. G.; CALDAS, S. S. EXTRAÇÃO DE PARABENOS EM AMOSTRAS DE CAMARÃO: ESTUDO DE MÉTODO EMPREGANDO DISPERSÃO DA MATRIZ EM FASE SÓLIDA. In: 19º ENQA - Encontro Nacional de Química Analítica, 2018, Caldas Novas.

ARIAS, J.L.O.; SCHNEIDER, A.; ANDRADE, J. A. B.; VIEIRA, A. A.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. USO DE QUITOSANA NA ETAPA DE LIMPEZA DO MÉTODO QuEChERS PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM AMOSTRAS DE LEITE. In: 18º Encontro Nacional de Química Analítica, 2016, Florianópolis.

ARIAS, J.L.O.; SCHNEIDER, A.; ANDRADE, J. A. B.; VIEIRA, A. A.; GEHRKE, V. R.; CAMARGO, E. R.; PRIMEL, E. G. DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE S-METOLACLORO E METOLACLORO-OA EMPREGANDO FILTRAÇÃO-DILUIÇÃO-INJEÇÃO, SPE E LC-MS/MS. In: 18º Encontro Nacional de Química Analítica, 2016, Florianópolis.

ANDRADE, J. A. B.; TAVELLA, R. A.; CALDAS, S. S.; **ARIAS, J.L.O.**; CASTRO, I. B.; FILLMAN, G.; PRIMEL, E. G. ANTIFOULING BOOSTER BIOCIDES IN COASTAL WATERS OF PANAMA. In: 18º Encontro Nacional de Química Analítica, 2016, Florianópolis.

SCHNEIDER, A.; TAVELLA, R. A.; **ARIAS, J.L.O.**; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO EMPREGANDO SILLME, LC-DAD E LC-

MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE PARABENOS EM AMOSTRAS DE ÁGUA. In: 18º Encontro Nacional de Química Analítica, 2016, Florianópolis.

ANDRADE, J. A. B.; VIEIRA, A. A.; CALDAS, S. S.; **ARIAS, J.L.O.**; CASTRO, I. B.; FILLMAN, G.; PRIMEL, E. G. ESTUDO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE BIOCIDAS ANTI-INCRUSTANTES EM SEDIMENTOS MARINHOS. In: 18º Encontro Nacional de Química Analítica, 2016, Florianópolis.

GEHRKE, V. R.; CAMARGO, E. R.; AVILA, L. A.; **ARIAS, J.L.O.**; PRIMEL, E. G.; NOGUEIRA, E. A.; BRUNETTO, F. Uso de faixas de vegetação filtro na redução do escoamento superficial de S-metolachlor e metolachlor ácido oxanílico. In: XXX Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas, 2016, Curitiba.

RODRIGUES, S. A.; ZAMBIAZI, R. C.; ROMBALDI, C. V.; CHAVES, F. C.; PRIMEL, E. G.; CALDAS, S. S.; **ARIAS, J. L. O.** VALIDAÇÃO DE MÉTODO EMPREGANDO SPE E HPLC-ESI-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS E MICOTOXINAS EM VINHOS. In: XXIII Encontro de Química da Região Sul, 2016, Santa Maria.

CABRERA, L. C.; STEINKE, G.; VIEIRA, M. G.; **ARIAS, J.L.O.**; PRIMEL, E. G. Determinação de Medicamentos Veterinários em Amostras de Leite em Cidades da Região Sudoeste do Paraná. In: I Congresso Internacional de Ciência, Tecnologia e Inovação e XV Encontro de Iniciação Científica da UNIPAR, 2016, Umuarama.

CABRERA, L. C.; VIEIRA, M. G.; STEINKE, G.; **ARIAS, J.L.O.**; PRIMEL, E. G. Determinação de Agrotóxicos em Amostras de Água de Cidades do Sudoeste do Paraná. In: I Congresso Internacional de Ciência, Tecnologia e Inovação e XV Encontro de Iniciação Científica da UNIPAR, 2016, Umuarama.

APÊNDICE A

Tabela A1. Composição dos diferentes alimentos avaliados neste trabalho (TBCA, 2019)

Categoria	Matriz	N	Carboidratos	Proteínas	Gordura	n - Benzoato	n - Sorbato	n - Parabenos
Laticínios	logurte	3	10,9	3,12	2,17	0	3	0
	Petit suisse	3	18,5	5,79	2,84	0	3	0
	Queijo ralado	3	4,83	32,1	36,7	0	3	0
	Margarina	3	0,0	0,0	71,1	2	3	0
	Bebida láctea	3	10,2	3,01	1,68	0	3	0
	Requeijão	3	3,03	9,91	25,5	0	3	0
	Doce de leite	3	58,8	6,12	6,26	0	3	0
Bebidas não alcoólicas	Suco de fruta	6	16,7	0,0	0,0	6	6	0
	Refrigerante	9	9,73	0,0	0,0	6	4	0
	Energético	3	10,2	0,46	0,0	3	0	0
	Bebida isotônica	3	6,40	0,0	0,0	3	1	0
Molhos e condimentos	Ketchup	4	29,8	1,74	0,31	1	3	0
	Mostarda	3	5,83	3,74	3,34	3	1	0
	Maionese	3	7,90	0,58	30,5	0	3	0
	Shoyu	3	29,5	3,47	0,24	2	2	0
Doces e geleias	Geleia	3	66,5	0,35	0,30	1	1	0
	Doce de fruta	3	75,0	0,0	0,0	2	3	0
Conservas	Azeitona	4	4,10	0,95	14,2	4	3	0
Fast food	Hamburguer	3	28,9	8,06	9,14	0	0	0
	Batata frita	3	33,7	4,45	12,8	0	0	0
	Bebida	3	9,73	0,0	0,0	0	0	0
	Sorvete	3	26,6	3,50	10,1	0	0	0
Adoçantes artificiais	Adoçante de mesa líquido	5	0,0	0,0	0,0	5	1	3
Total		82						

n – número de amostras, n – benzoato – número de amostras que contém benzoato, n – sorbato – número de amostras que contém sorbato, n – parabenos – número de amostras que contém parabenos

Tabela A2. Avaliação da exatidão, em termos de recuperação (R%), precisão do método QuEChERS, em termos de repetibilidade (RSD_r) e precisão intermediária (RSD_{pi}) e incerteza da medição (U %). Experimentos foram realizados utilizando como amostra representativa o ketchup, isenta de conservantes.

Conservante	Repetibilidade							Precisão intermediária						
	1 mg kg ⁻¹		5 mg kg ⁻¹		10 mg kg ⁻¹		U %	1 mg kg ⁻¹		5 mg kg ⁻¹		10 mg kg ⁻¹		U %
	R%	RSD_r	R%	RSD_r	R%	RSD_r		R%	RSD_{pi}	R%	RSD_{pi}	R%	RSD_{pi}	
Benzoato	94	6,0	94	1,9	94	0,8	14,7	85	3,3	95	1,1	86	2,4	14,7
Sorbato	90	2,5	89	2,6	92	0,6	20,2	94	2,6	95	1,3	92	0,9	20,2
Metilparabeno	91	4,8	88	3,8	92	0,5	20,6	99	3,7	92	2,5	90	2,0	20,6
Etilparabeno	89	7,1	87	2,9	99	0,4	18,9	102	8,0	90	3,1	95	0,5	18,9
Propilparabeno	87	2,8	88	2,5	92	0,3	22,8	94	1,5	90	2,9	88	0,3	22,8

Tabela A3. Avaliação da exatidão, em termos de recuperação (R%), precisão do método QuEChERS, em termos de repetibilidade (RSD_r) e precisão intermediária (RSD_{pi}) e incerteza da medição (U %). Experimentos foram realizados utilizando como amostra representativa a geleia de fruta, isenta de conservantes.

Conservante	Repetibilidade							Precisão intermediária						
	1 mg kg ⁻¹		5 mg kg ⁻¹		10 mg kg ⁻¹		U %	1 mg kg ⁻¹		5 mg kg ⁻¹		10 mg kg ⁻¹		U %
	R%	RSD _r	R%	RSD _r	R%	RSD _r		R%	RSD _{pi}	R%	RSD _{pi}	R%	RSD _{pi}	
Benzoato	109	4,2	100	6,5	92	1,0	9,3	105	7,2	95	2,1	91	1,1	7,3
Sorbato	93	5,0	87	3,3	99	0,6	16,8	97	1,9	92	1,7	99	0,8	8,0
Metilparabeno	96	6,1	87	5,1	94	0,6	18,0	91	7,7	95	3,3	91	0,8	17,4
Etilparabeno	96	4,4	85	3,6	93	0,3	18,7	97	0,7	93	1,1	93	0,6	11,0
Propilparabeno	92	5,8	86	4,5	94	0,6	20,8	98	2,2	93	1,3	92	0,6	11,6

Tabela A4. Avaliação da exatidão, em termos de recuperação (R%), precisão do método QuEChERS, em termos de repetibilidade (RSD_r) e precisão intermediária (RSD_{pi}) e incerteza da medição (U %). Experimentos foram realizados utilizando como amostra representativa o picles, isento de conservantes.

Conservante	Repetibilidade							Precisão intermediária						
	1 mg kg ⁻¹		5 mg kg ⁻¹		10 mg kg ⁻¹		U %	1 mg kg ⁻¹		5 mg kg ⁻¹		10 mg kg ⁻¹		U %
	R%	RSD _r	R%	RSD _r	R%	RSD _r		R%	RSD _{pi}	R%	RSD _{pi}	R%	RSD _{pi}	
Benzoato	100	17,0	86	0,4	90	5,7	26,0	103	11,0	85	4,1	89	7,7	26,9
Sorbato	93	14,6	83	0,2	87	4,3	31,2	97	4,7	92	3,0	93	8,5	16,1
Metilparabeno	94	7,8	81	2,6	85	4,1	26,7	97	7,4	86	3,1	91	8,3	21,7
Etilparabeno	87	8,9	79	2,6	85	0,8	34,5	92	2,9	84	2,1	87	9,4	26,3
Propilparabeno	88	6,3	77	4,4	82	0,8	39,1	91	2,4	81	3,1	87	10,7	29,3

Tabela A5. Avaliação da exatidão, em termos de recuperação (R%), precisão do método QuEChERS, em termos de repetibilidade (RSD_r) e precisão intermediária (RSD_{pi}) e incerteza da medição (U %). Experimentos foram realizados utilizando como amostra representativa o refrigerante, isento de conservantes.

Conservante	Repetibilidade							Precisão intermediária						
	1 mg kg ⁻¹		5 mg kg ⁻¹		10 mg kg ⁻¹		U %	1 mg kg ⁻¹		5 mg kg ⁻¹		10 mg kg ⁻¹		U %
	R%	RSD _r	R%	RSD _r	R%	RSD _r		R%	RSD _{pi}	R%	RSD _{pi}	R%	RSD _{pi}	
Benzoato	86	3,1	89	2,2	91	2,7	23,3	96	10,4	89	2,4	87	2,2	25,5
Sorbato	89	2,2	90	1,0	90	2,4	20,7	98	5,8	90	3,3	91	2,1	15,3
Metilparabeno	81	4,5	86	1,4	89	2,8	30,6	104	2,6	90	2,5	90	2,0	11,4
Etilparabeno	89	1,7	89	0,3	89	2,4	22,1	92	1,0	89	2,5	89	2,2	19,8
Propilparabeno	89	3,2	87	1,3	91	2,6	23,1	91	0,2	89	2,6	89	2,2	20,7

Tabela A6. Avaliação da exatidão, em termos de recuperação (R%), precisão do método QuEChERS, em termos de repetibilidade (RSD_r) e precisão intermediária (RSD_{pi}) e incerteza da medição (U %). Experimentos foram realizados utilizando como amostra representativa o iogurte, isento de conservantes.

Conservante	Repetibilidade							Precisão intermediária						
	1 mg kg ⁻¹		5 mg kg ⁻¹		10 mg kg ⁻¹		U %	1 mg kg ⁻¹		5 mg kg ⁻¹		10 mg kg ⁻¹		U %
	R%	RSD _r	R%	RSD _r	R%	RSD _r		R%	RSD _r	R%	RSD _r	R%	RSD _r	
Benzoato	106	2,1	103	1,3	100	2,4	6,0	105	5,2	104	5,8	100	1,2	10,4
Sorbato	84	7,6	91	3,6	89	2,8	25,1	94	3,7	85	2,8	88	1,5	25,3
Metilparabeno	94	2,9	89	0,4	90	3,2	18,6	91	1,8	83	4,7	88	2,3	25,5
Etilparabeno	93	1,0	89	0,6	89	2,7	19,8	94	2,1	84	4,8	90	2,1	22,0
Propilparabeno	93	0,2	90	1,3	77	20,2	30,5	94	1,7	85	4,4	89	2,2	21,8

