



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ARIANA MARIA DOS SANTOS LIMA**

**CARACTERIZAÇÃO DE NUTRIENTES MINERAIS E DETERMINAÇÃO  
DE PESTICIDAS EM HORTALIÇAS CONSUMIDAS NA CIDADE DE  
SALVADOR, BAHIA**

**SALVADOR - BA**

**MAIO DE 2021**

**ARIANA MARIA DOS SANTOS LIMA**

**CARACTERIZAÇÃO DE NUTRIENTES MINERAIS E DETERMINAÇÃO  
DE PESTICIDAS EM HORTALIÇAS CONSUMIDAS NA CIDADE DE  
SALVADOR, BAHIA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Doutor em Química Analítica.

**Orientador:** Prof. Dr. Sérgio Luis  
Costa Ferreira

**SALVADOR - BA**

**MAIO DE 2021**

**ARIANA MARIA DOS SANTOS LIMA**

**CARACTERIZAÇÃO DE NUTRIENTES MINERAIS E DETERMINAÇÃO  
DE PESTICIDAS EM HORTALIÇAS CONSUMIDAS NA CIDADE DE  
SALVADOR, BAHIA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Doutor em Química Analítica.

Salvador, 06 de Maio de 2021

**Banca examinadora**

Prof. Dr. Sérgio Luis Costa Ferreira, Orientador \_\_\_\_\_  
Doutor em Química, pela Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

Prof. Dr<sup>a</sup> Ana Pinto \_\_\_\_\_  
Doutora em Química, pela Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr<sup>a</sup> Débora Andrade \_\_\_\_\_  
Doutora em Química, pela Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Anderson Souza \_\_\_\_\_  
Doutor em Química, pela Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. João Batista \_\_\_\_\_  
Doutor em Química, pela Universidade Federal do Pará



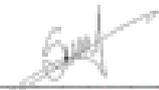


## TERMO DE APROVAÇÃO

ARIANA MARIA DOS SANTOS LIMA

“CARACTERIZAÇÃO DOS NUTRIENTES MINERAIS E DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS EM HORTALIÇAS CONSUMIDAS NA CIDADE DE SALVADOR, BAHIA”

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor(a) em Química, Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Sergio Luis Costa Ferreira   
Doutorado em Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC - Rio)  
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr.ª Ana Maria Pinto dos Santos   
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)  
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. João Batista Pereira Junior   
Doutorado em Química, Universidade Federal do Pará (UFPA)  
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr.ª Débora de Andrade Santana   
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)  
Universidade do Estado da Bahia

Prof. Dr. Anderson Santos Souza   
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)  
Universidade Federal da Bahia

Salvador, 06 de maio de 2021.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Ciências e Tecnologias Prof. Omar Catunda, SIBI - UFBA.

**C871** Lima, Ariana Maria dos Santos

Caracterização dos nutrientes minerais e determinação de pesticidas em hortaliças consumidas na cidade de Salvador, Bahia/ Ariana Maria dos Santos Lima. –Salvador, 2021.  
139f.

Orientadora: Prof. Dr. Sérgio Luis Costa Ferreira

Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia.  
Instituto de Química, 2021.

1.Avaliação nutricional. 2. Hortaliças. 3. Análise Multivariada. 4.Pesticidas. I. Ferreira, Sérgio Luis Costa. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

**CDU:616-083:173.4**

Dedico este trabalho a minha família, amigos e aos professores que contribuíram para minha formação.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pelos momentos de sabedoria e por estar presente na minha vida em todos os momentos.

A minha mãe e meu pai, pelo amor e apoio incondicional, exemplos de sabedoria e força do qual me espelho, e por me ajudar a suportar alguns momentos de inquietude e incertezas.

A minha irmã e minha avó pelo amor, apoio e compreensão.

A meu orientador, o Prof. Dr. Sérgio Luis Costa Ferreira, pela oportunidade, orientação, pela paciência, por acreditar e confiar em mim. Além de me enriquecer com preciosas discussões durante a elaboração deste trabalho.

A Gabriella e Lidio, amigos do meu coração, me acompanharam desde o início da minha trajetória acadêmica, obrigada pela grande amizade, pelos momentos de descontração e por toda a confiança que temos.

A Daniel Levi, outro amigo querido, por me entender, me apoiar e ter me ajudado inúmeras vezes.

Aos colegas do Grupo de Pesquisa em Química e Quimiometria (GRPQQ), por ter me acolhido nesse grupo, tive manhãs e tardes agradáveis no laboratório e nas reuniões graças a vocês.

Ao CNPQ, pela bolsa concedida durante o período de realização desse trabalho.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação Gráfica das componentes principais.....	34
Figura 2 - conjunto de dados originais, b) conjunto de dados após PCA .....	35
Figura 3 – Estágios de formação dos clusters.....	36
Figura 4 – Representação do dendrograma.....	36
Figura 5 – Representação gráfica dos limites lineares.....	38
Figura 6- Preparo das amostras, a) aspectos da amostra pós corte e b) recipiente de armazenamento. ....	46
Figura 7 - Aspecto da amostra digerida com menor volume de ácido.....	47
Figura 8 – Aparato para cozimento em vapor .....	48
Figura 9 – Gráfico dos teores de macrominerais de acordo com o tipo de processamento térmico em amostras de folhas de mostarda .....	58
Figura 10 – Gráfico dos teores de microminerais de acordo com o tipo de processamento em amostras de folhas de mostarda.....	58
Figura 11 - Gráfico dos teores de macrominerais de acordo com o tipo de processamento em amostras de folhas de chicória .....	63
Figura 12- Gráfico dos teores de microminerais de acordo com o tipo de processamento em amostras de folhas de chicória .....	63
Figura 13 – Gráfico de Pesos.....	66
Figura 14 – Gráfico de scores das amostras de mostarda.....	66
Figura 15 - Dendrograma para amostras de mostarda de acordo com os métodos de cocção.....	68
Figura 16 - Biplot dos discriminantes (Crua x Vapor) .....	70

Figura 17- Biplot dos discriminantes (Cozida x Micro-ondas).....	71
Figura 18 - Gráfico de scores para as amostras de chicória .....	72
Figura 19 - Gráfico de pesos .....	73
Figura 20 - Dendrograma para as amostras de chicória de acordo com os métodos de cocção .....	75
Figura 21 – Teores de potássio nas amostras de mostarda .....	78
Figura 22 - Teores de potássio em amostras de chicória.....	78
Figura 23 - Estrutura geral dos organofosforados .....	84
Figura 24 - Estrutura química geral dos carbamatos.....	85
Figura 25 – Estrutura química da Aletrina .....	86
Figura 26 - Estrutura química da Estrobirulina - A.....	88
Figura 27 – Estrutura da Permitrina .....	94
Figura 28 – Esquema de extração líquido-líquido e partição em baixa temperatura (ELL-PBT) .....	98
Figura 29 – Cromatograma obtido pelo método de varredura SCAN.....	105

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros instrumentais do ICP OES .....	49
Tabela 2 – Valores de LD E LQ para as amostras de folha de mostarda e chicória .....	50
Tabela 3 – Valores de sensibilidade, faixa linear e coeficiente de determinação para ao analitos determinados nas folhas de mostarda e chicória.....	51
Tabela 4 – Valores de desvio padrão relativo, referente a dez repetições.....	52
Tabela 5 - Comparação entre as concentrações dos analitos no material certificado (n=3) .....	54
Tabela 6 – Comparativo entre amostra de mostarda e a tabela de referência ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ).....	56
Tabela 7 – Dados de concentração em $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ da folha de chicória crua. ...	61
Tabela 8 – Peso das variáveis em PC1 e PC2 .....	65
Tabela 9 - Matriz de correlação .....	68
Tabela 11 – Matriz de correlação.....	74
Tabela 12 – Porcentagem de IDR para o consumo de 100g de mostarda e chicória .....	77
Tabela 13 - Equação de reta dos pesticidas com uso do protetor de analito ....	107
Tabela 14 - Limites de detecção e quantificação .....	108
Tabela 15 - Precisão inter-dia e intra-dia (continua) .....	109
Tabela 16 – Precisão inter-dia e intra-dia (conclusão).....	110
Tabela 17 - Recuperações obtidas a partir da fortificação da amostra de alface fresca com 2, 5 e $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de pesticida.....	111

Tabela 18 - Concentração dos pesticidas em amostras de alface (n=3) ..... 113

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Minerais e suas funções no organismo (continua) .....	30
Quadro 2 – Determinação de minerais em amostras de vegetais usando ICP-OES	42
Quadro 3 – Metodologia de cocção empregados.....	49
Quadro 4 – Classificação de acordo com a DL <sub>50</sub> .....	89
Quadro 5 - Nova classificação com base no método GHS .....	90
Quadro 6 - Pesticidas determinados em alface.....	102

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**FDA** – Administração de drogas e alimentos, do inglês *Food and Drugs Administration*

**HCA** – Análise de Componentes Hierárquicos, do inglês *Cluster Hierarquic Analysis*

**ICP OES** – Plasma Indutivamente Acoplado à Espectrometria de Emissão Ótica

**ICP MS** – Plasma Indutivamente Acoplado à Espectrometria de Massa

**LDA** – Análise de Discriminantes Lineares, do inglês *Linear Discriminante Analysis*

**PC** – Componente Principal, do inglês *Principal Component*

**PCA** – Análise de Componentes Principais, do inglês *Principal Components Analysis*

**OMS** – Organização Mundial da Saúde

**TACO** – Tabela de Composição de Alimentos

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

## RESUMO

LIMA, ARIANA M. S. **Caracterização de nutrientes minerais e determinação de pesticidas em hortaliças consumidas na cidade de Salvador, Bahia.** 2021. 139f. Tese de Doutorado - Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2021.

Neste trabalho foram desenvolvidos dois métodos de determinação de minerais, presente no capítulo I e de pesticidas, no capítulo II, ambos com intuito de avaliar nutricionalmente as hortaliças mostarda e chicória, consumidas na cidade de Salvador, Bahia. No primeiro capítulo, duas gramas das amostras de mostarda e chicória foram digeridas em bloco digestor por duas horas, utilizando 3 e 4 mL, respectivamente, de ácido e 1 mL de peróxido de hidrogênio, os minerais (Ba, Ca, Fe, K, Mg, Na, P, S e Zn), foram determinados utilizando ICP OES. Para validar o método foram obtidos os parâmetros de mérito, a precisão ficou entre 0,2-8,8%, os valores de LD e LQ foram considerados satisfatórios, e a avaliação da exatidão ficou por conta do uso do CRM NIST 1515 de folhas de maçã, que considerando o teste t e teste F, num intervalo de 95% de confiança confirma a acuraria do método. Foram avaliados os diferentes métodos de cocção: vapor, cozida em fogão convencional e micro-ondas. Com os resultados, foi possível inferir que o processo de cozimento influencia na composição e disponibilidade dos nutrientes, apresentando o padrão de perda de nutrientes: crua>vapor>cozida>micro-ondas, já o PCA e HCA permitiu reconhecer que as amostras que passaram pelo mesmo método de cozimento formaram os quatro grupos distintos, indicando a similaridade das amostras e o LDA permitiu a separação clara de classes entre as amostras de cada tipo de cozimento, com taxas de 100% seletividade, exatidão e sem a presença de falsos positivos ou negativos. No segundo capítulo, foi desenvolvido um método adaptado usando a técnica de partição por baixa temperatura com o objetivo de determinar vinte e seis pesticidas por CG-MS, consistiu na extração de 4g de amostra previamente maceradas com uma combinação de acetato de atila/água (8:1, v/v), essa mistura agitada em vortex por 10 min, centrifugada por 3 minutos a 300 rpm e levada ao freezer (-20°C) até congelamento, mais ou menos por volta de 3h. Os resultados obtidos foram satisfatórios com boa linearidade ( $r^2$ : 9936-0,9994), LD variando de 0,1-0,4  $\mu\text{g L}^{-1}$  e LQ variando de 0,34-1,9  $\mu\text{g L}^{-1}$ . A precisão inter e intra-dia estavam dentro dos parâmetros de referência, entre 6,3-23,4% e 2,7-18,3%, respectivamente. Para verificar a exatidão ensaios de recuperação em três níveis de fortificação foram realizados e todos os resultados foram superiores a uma recuperação de 70%. Todos os dados indicam que o método é robusto, preciso e confiável. Dos vinte e cinco pesticidas estudados, três apresentaram concentrações abaixo do limite de detecção e treze não foram detectados, indicando a não presença dessas substâncias nas amostras, porém três pesticidas foram detectados com concentração acima do limite máximo permitido pela legislação.

**Palavras-chave:** hortaliças, minerais, processos de cocção, análise multivariada, pesticidas.

## ABSTRACT

LIMA, ARIANA M. **Characterization of mineral nutrients and pesticide determination in vegetables consumed in the city of Salvador, Bahia.** 2021. 139f. Tese de Doutorado - Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2021.

In this work, two methods of determination of minerals, present in chapter I and pesticides, in chapter II, were developed, both aiming to nutritionally evaluate mustard and chicory vegetables consumed in the city of Salvador, Bahia. In the first chapter, two grams of mustard and chicory samples were digested in a block for two hours, using 3 and 4 mL, respectively, of acid and 1 mL of hydrogen peroxide, the minerals (Ba, Ca, Fe, K, Mg, Na, P, S e Zn) were determined using ICP OES. To validate the method, the merit parameters were obtained, the precision was between 0.2-8.8%, the LD and LQ values were considered satisfactory, and the accuracy evaluation was due to the use of the CRM NIST 1515 sheets of apple, which considering the t-test and the F-test, within a 95% confidence interval confirms the accuracy of the method. The different cooking methods were evaluated: steam, cooked in a conventional stove and microwave. With the results, it was possible to infer that the cooking process influences the composition and availability of nutrients, showing the pattern of nutrient loss: raw>steam>cooked>microwave, while the PCA and HCA allowed to recognize that the samples that passed by the same cooking method they formed the four distinct groups, indicating the similarity of the samples and the LDA allowed a clear separation of classes between the samples of each type of cooking, with rates of 100% selectivity, accuracy and without the presence of false positives or negative. In the second chapter, an adapted method was developed using the low temperature partition technique in order to determine twenty-six pesticides by GC-MS, consisting of the extraction of 4g of sample previously macerated with a combination of ethyl acetate/water ( 8:1, v/v), this mixture is vortexed for 10 min, centrifuged for 3 minutes at 300 rpm and taken to the freezer (-20°C) until freezing, approximately 3h. The results obtained were satisfactory with good linearity ( $r^2$ : 0.9936-0.9994), LD ranging from 0.1-0.4  $\mu\text{g L}^{-1}$  and LQ ranging from 0.34-1.9  $\mu\text{g L}^{-1}$ . The inter and intra-day precision were within the reference parameters, between 6.3-23.4% and 2.7-18.3%, respectively. To verify the accuracy, three-level fortification recovery tests were performed and all results were above a 70% recovery. All data indicate that the method is robust, accurate and reliable. Of the twenty-five pesticides studied, three had concentrations below the detection limit and thirteen were not detected, indicating the absence of these substances in the samples, but three pesticides were detected with concentrations above the maximum limit allowed by legislation.

**Keywords:** vegetables, minerals, cooking processes, multivariate analysis, pesticides.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	9
LISTA DE TABELAS .....	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	14
RESUMO.....	15
ABSTRACT .....	16
SUMÁRIO.....	17
INTRODUÇÃO .....	22
CAPÍTULO I – DETERMINAÇÃO DE MACRO E MICROMINERAIS EM AMOSTRAS DE HORTALIÇAS POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO .....	25
1. HORTALIÇAS.....	26
1.1. MOSTARDA ( <i>Brassica juncea</i> (L.) Coss.) e CHICÓRIA ( <i>Cichorium intybus</i> )	28
2. MACRO E MICROMINERAIS NO CORPO HUMANO.....	29
3. INFLUÊNCIA DO MÉTODO DE COZIMENTO .....	31
4. AVALIAÇÃO QUÍMIOMETRICA – MÉTODOS NÃO-SUPERVISIONADOS.....	33
4.1. ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) .....	34
4.2. ANÁLISE DE COMPONENTES HIERÁRQUICOS (HCA) .....	35
5. AVALIAÇÃO QUÍMIOMETRICA – MÉTODOS SUPERVISIONADOS .....	37
5.1. LDA.....	38
5.2. AVALIAÇÃO DO MODELO SUPERVISIONADO DE ANÁLISE.....	40

6. DETERMINAÇÃO DE MINERAIS POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO (ICP-OES).....	41
7. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	43
7.1. LIMITE DE DETECÇÃO (LD) e QUANTIFICAÇÃO (LQ); .....	43
7.2. SENSIBILIDADE E LINEARIDADE .....	44
7.3. FAIXA LINEAR DE TRABALHO.....	44
7.5. PRECISÃO.....	45
7.6. EXATIDÃO .....	45
8. PARTE EXPERIMENTAL.....	45
8.1. COLETA DAS AMOSTRAS .....	45
8.2. PRÉ-TRATAMENTO.....	46
8.3. PROCEDIMENTO DE DIGESTÃO DAS AMOSTRAS .....	46
8.4. SISTEMA E METODOS DE COCÇÃO EMPREGADOS.....	48
48	
8.5. INSTRUMENTAL .....	49
8.6. REAGENTE E SOLUÇÕES .....	50
9.    PARAMÊTROS ANALÍTICOS.....	50
9.2. LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO .....	50
9.3. SENSIBILIDADE, FAIXA DE TRABALHO E LINEARIDADE .....	51
9.4.    PRECISÃO .....	51
9.5.    EXATIDÃO .....	52

10. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	55
10.1. COMPOSIÇÃO MINERAL DAS FOLHAS DE MOSTARDA DE ACORDO COM O MÉTODO DE COZIMENTO .....	55
10.2. COMPOSIÇÃO MINERAL DAS FOLHAS DE CHICÓRIA DE ACORDO COM O MÉTODO DE COCÇÃO.....	61
11. ANÁLISE MULTIVARIADA DAS AMOSTRAS DE MOSTARDA E CHICÓRIA .	64
11.1. AMOSTRAS DE MOSTARDA.....	65
11.2. AMOSTRAS DE CHICÓRIA.....	72
12. INGESTÃO DIÁRIA RECOMENDADA (IDR) E O CONSUMO DE POTÁSSIO EM PACIENTES COM PROBLEMAS RENAIIS.....	75
13. CONCLUSÕES PARCIAIS .....	79
CAPÍTULO II – DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS EM HORTALIÇAS POR CG-MS	
80	
1. PESTICIDAS.....	81
1.1. CLASSIFICAÇÃO DOS PESTICIDAS .....	82
1.1.1. ORGANOCLORADOS .....	83
1.1.2. ORGANOFOSFORADOS.....	84
1.1.3. CARBAMATOS.....	85
1.1.4. PIRETROÍDES.....	86
1.1.5. AZÓIS.....	87
1.1.6. ESTROBIRULINAS.....	88
1.1.7. QUANTO A TOXICIDADE .....	89

1.2.	LEGISLAÇÃO – USO DOS PESTICIDAS NO BRASIL .....	90
2.	MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS.....	91
2.1.	CROMATOGRAFIA GASOSA.....	92
2.1.1.	PROTETORES DE ANALITO.....	95
3.	MÉTODO DE EXTRAÇÃO – LOW PARTITION TEMPERATURE .....	97
4.	PARÂMETROS ANALÍTICOS.....	99
4.1.	ESPECIFICIDADE E SELETIVIDADE .....	99
4.2.	EXATIDÃO E RECUPERAÇÃO.....	100
5.	METODOLOGIA .....	100
5.1.	COLETA DAS AMOSTRAS .....	100
5.2.	PRÉ-TRATAMENTO .....	100
5.3.	PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO - <i>Low temperature partitioning</i> ....	100
5.4.	INSTRUMENTAL.....	101
5.5.	CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS .....	101
5.6.	PESTICIDAS DETERMINADOS.....	102
5.7.	REAGENTES E SOLUÇÕES .....	103
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	103
6.1.	METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO ELL-EBT .....	103
6.2.	ANÁLISE CROMATOGRÁFICA .....	105
6.2.	PARÂMETROS ANALÍTICOS.....	106
6.2.1.	CURVA DE CALIBRAÇÃO EXTERNA X PROTETOR DE ANALITO .....	106

6.2.2. LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO .....	108
6.2.3. PRECISÃO .....	109
6.2.4. RECUPERAÇÃO DOS PESTICIDAS .....	111
6.3. APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS REAIS .....	113
7. CONSIDERAÇÕES PARCIAIS.....	115
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	116
APÊNDICE .....	130

## INTRODUÇÃO

Cada vez mais é debitado aos hábitos alimentares, a diminuição dos riscos de adquirir determinadas comorbidades e levar a melhoria da qualidade de vida. Entretanto, apesar das recomendações internacionais e nacionais de consumo e da variedade de tipos e de preparações culinárias em que esses alimentos podem ser ingeridos, seu consumo permanece aquém do desejado em grande parte dos países, sendo o cenário ainda pior para as hortaliças quando comparado ao de frutas (1). Desta forma, o estudo da composição dos alimentos é de extrema importância nutricional.

Os alimentos naturais são as principais fontes de minerais para o organismo, tanto os de origem vegetal como animal (2). As hortaliças verdes, como chicória e mostarda, são um importante componente da dieta, sendo tradicionalmente servidas junto com um alimento proteico (carne ou peixe) e um carboidrato (massa ou arroz). Elas fornecem não apenas variedade de cor e textura às refeições, mas também nutrientes importantes. As hortaliças têm pouca gordura e calorias, relativamente pouca proteína, mas são ricas em carboidratos e fibras e fornecem níveis significativos de micronutrientes à dieta (3), sendo considerado um alimento funcional.

No primeiro capítulo deste trabalho, tanto os métodos exploratórios quanto métodos supervisionados de reconhecimento de padrões foram utilizados para agrupar, simplificar e classificar dados obtidos através das análises realizadas por Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES) em amostras de folhas de mostarda e chicória, comercializadas em diferentes mercados de Salvador e região, Brasil, comparando teores de minerais (Ba, Ca, Fe, K, Mg, Na, P, S e Zn) considerando diferentes métodos de cozimento que incluem vapor, micro-ondas e cozido em fogão convencional.

Para verificar essas similaridades e agrupamentos, o uso da análise multivariada – exploratórios e supervisionados, incluindo a Análise de Componentes Principais (PCA) e a Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA), metodologias exploratórias que visam buscar similaridades ou diferenças entre amostras, e são os tipos de análise mais empregadas na literatura. Na segunda categoria, o uso do LDA é

aplicado para calcular uma função de discriminação linear entre amostras de determinados grupos, a fim de classifica-los.

Por ser um alimento natural, e produto de agricultura, o monitoramento de agrotóxicos em hortaliças é considerado imprescindível, pois o consumo deste tipo de substância afeta diretamente a saúde, devido a toxicidade. A importância do monitoramento desses produtos desperta a atenção de vários setores da sociedade (4).

Portanto, no segundo capítulo, foi elaborado um método para determinação de vinte e cinco pesticidas através da Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de massas (CG-MS) e utilizando a Extração Líquido-líquido e partição em baixa temperatura (ELL-PBT) como método de extração.

## **OBJETIVO GERAL**

Avaliar nutricionalmente o teor de minerais em amostras de mostarda e chicória, e pesticidas em alface, utilizando a análise multivariada como forma de padronizar e classificar essas amostras.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Analisar a diferenças entre os teores de minerais das hortaliças estudadas de acordo com o método de cocção;
- Evidenciar qual melhor processo de cozimento para evitar grandes perdas de nutrientes;
- Contribuir com a tabela de composição de alimentos.
- Utilizar métodos não supervisionados de análise multivariada, como PCA e HCA, para reconhecer padrões;
- Utilizar métodos supervisionados de análise multivariada, como LDA, para classificar as amostras em classes;
- Desenvolver um método para determinação de diferentes classes de pesticidas utilizando a Extração líquido-líquido e partição em baixa temperatura (ELL-PBT);
- Determinar a concentração dos pesticidas em amostras de hortaliças;
- Comparar o resultado com limites estabelecidos pela legislação vigente.

**CAPÍTULO I – DETERMINAÇÃO DE MACRO E MICROMINERAIS EM  
AMOSTRAS DE HORTALIÇAS POR ESPECTROMETRIA DE  
EMISSÃO ÓPTICA COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO**

## 1. HORTALIÇAS

Segundo a ANVISA, Associação Nacional de Vigilância Sanitária, hortaliças são denominadas plantas herbáceas das quais uma ou mais partes são utilizadas como alimento na sua forma natural, podendo ser classificadas como: verduras, legumes e raízes, tubérculos e rizomas. (5)

Devido aos nutrientes que possuem, o consumo diário de hortaliças é extremamente benéfico para a saúde, pois possuem gorduras, carboidratos, minerais, antioxidantes, fibras e água, bem como excelentes fontes de  $\beta$ -caroteno (provitamina A), tiamina (B1), riboflavina (B2), niacina, piridoxina (B6), ácido pantotênico, ácido fólico, ácido ascórbico e vitamina E e K. A (6). Além disso, possuem baixa densidade energética aumentando a saciedade (efeito manifestado após o término da alimentação) e a saciação (efeito que determina a finalização da refeição), bem como poucas calorias, favorecendo o estilo de vida mais saudável.

Tendo em vista esse quadro, a OMS, Organização Mundial da Saúde indica o consumo de 400g de frutas e hortaliças, o que equivale a aproximadamente 5 porções diárias (7). Essa quantidade é considerada elevada pois apesar das hortaliças apresentarem um alto valor nutricional, o organismo normalmente não os absorve de forma totalitária, pois primeiramente o nutriente precisa estar bioacessível (fração do nutriente que é liberado no trato gastrointestinal pelo processo digestivo) e em seguida biodisponível (fração do nutriente que foi absorvido pelas funções metabólicas do organismo). Esse processo varia para cada pessoa em questão, porém com o hábito de consumo a biodisponibilidade desses compostos tende a aumentar.

Segundo a *World Health Organization*, WHO (8), consumo de frutas e vegetais pode prevenir doenças cardiovasculares e até certos tipos de câncer, estima-se que a ingestão baixa de frutas e vegetais cause cerca de 31% da doença cardíaca isquêmica e 11% do AVC em todo o mundo. No geral, estima-se que até 2,7 milhões de vidas possam ser salvas anualmente se o consumo de frutas e vegetais for aumentado, vale salientar que um baixo consumo de frutas e vegetais (menos de 400g por dia) é considerado um dos 10 principais fatores de risco para a mortalidade e estima-se que resulte em 1,7 milhões de mortes globais por ano (9).

Diante disso, muitos estudos são feitos para melhor explorar e amplificar o conhecimento quanto aos benefícios destes tipos de alimentos, bem como relacionar os teores de nutrientes inorgânicos ou orgânicos ao estilo de vida, minimização de riscos associados a doenças, dentre outros. Em 2016, Kim e colaboradores (10), estudaram a relação entre a densidade óssea e ingestão dietética de  $\beta$ -caroteno, vitamina C, zinco através do consumo de vegetais em mulheres coreanas após a menopausa. Os autores chegaram à conclusão após o acompanhamento de 189 mulheres, que uma alta ingestão de vegetais verdes (hortaliças) ricos em carotenoides antioxidantes pode ser benéfica para a saúde óssea em mulheres na pós-menopausa.

Ainda no que diz respeito à saúde feminina, Mattioli et. al (2018), liderou um estudo com 650 mulheres em idades entre 45-54 anos, na qual as mesmas consumiam uma porção de frutas e verduras três vezes na semana, de acordo com seus hábitos diários. O aumento da ingestão de vegetais foi associado ao menor risco de doença arterial periférica, que segundo o autor é devido as propriedades antioxidantes, presença de carotenoides, vitaminas A e C, protegendo contra os radicais livres de oxigênio e a peroxidação lipídica (11).

Em 2003, a *World Health Organization* (WHO) realizou um compilado com estudos de diferentes autores que relacionavam nutrição, dieta e a prevenção de doenças crônicas, reforçando o consumo de vegetais como um alimento nutritivo e ressaltando que o benefício de frutas e legumes não pode ser atribuído a uma única mistura de nutrientes e substâncias bioativas.

Isso demonstra que muitos trabalhos na literatura se debruçam em estudar a diminuição da manifestação de determinadas doenças, quando se consome a quantidade recomendada de vegetais, bem como a quantificação dos teores de nutrientes orgânicos e inorgânicos nesses tipos de alimentos. Entretanto, vale ressaltar que muitos autores também trazem a preocupação em subestimar alguns resultados, já que fatores ambientais, como o uso de herbicidas, pesticidas, contaminação do solo e da água, podem afetar a qualidade nutricional desses alimentos.

Portanto, é necessário ter cuidado quanto a metodologia escolhida, desde a coleta dessas amostras, passando pelo seu preparo, e principalmente com a interpretação dada a esses dados, a fim que esses sejam os mais fidedignos possíveis.

### 1.1. MOSTARDA (*Brassica juncea* (L.) Coss.) e CHICÓRIA (*Cichorium intybus*)

Existem várias espécies de mostarda, todas da família *Brassicaceae*, portanto próximas ao repolho, à couve-flor, à couve comum e ao nabo. As folhas de mostarda apresentam sabor bem mais pronunciado quando comparadas às folhas de couve e espinafre. O sabor picante é característico dessa hortaliça. É fonte de vitaminas C e A, de cálcio e possui teores moderados de ferro, sódio, potássio e magnésio (12).

Conhecida como mostarda indiana ou mostrada-folha é uma planta de rápido crescimento que produz uma biomassa elevada mesmo em solos poluídos de metais pesados. Essa planta apresenta um potencial fitofiltração e/ou fitoestabilização de águas residuais contaminadas com metais pesados. Até agora, esta espécie de planta tem sido utilizada em estudos dos efeitos de metais pesados como o cádmio (13).

Já, o gênero *Cichorium* (*Asteraceae*) é composto por seis espécies com grande presença geográfica na Europa e na Ásia. *Cichorium intybus*, comumente conhecido como chicória, é bem conhecido como um substituto do café,

Em relação ao café a chicória apresenta as seguintes vantagens: contém maior quantidade de substâncias solúveis, pode mesmo considerar-se um alimento, devido ao seu maior valor nutritivo e ausência de cafeína, que permitem o seu consumo em maiores quantidades e é mais barata que o café (14). Nesta vertente, a chicória é consumida em vários países da Europa, e consumida também em outras regiões do mundo, como por exemplo África do Sul, EUA e Índia.

Muitos artigos trazem a análise de compostos fenólicos desta hortaliça (15–17), o que evidencia sua capacidade de ser um alimento com características antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e anticarcinogênica, além disso a ingestão de produtos vegetais está associada com uma redução no risco de uma variedade de doenças crônicas como aterosclerose e câncer.

Esses efeitos têm sido particularmente atribuídos aos compostos que possuem atividade antioxidante. Os principais antioxidantes nos vegetais são as vitaminas C e E, os carotenoides e os compostos fenólicos, especialmente os flavonoides, devido a sua habilidade em doar hidrogênio ou elétrons, mas também em virtude de seus

radicais intermediários estáveis, que impedem a oxidação de vários ingredientes do alimento, particularmente de lipídios (18).

Porém apesar da parte morfológica e de componentes orgânicos estar bem respaldada na literatura, ainda carecem de informações a respeito dos macros e micronutrientes existentes nestas hortaliças, principalmente sobre as possíveis variações de concentração quando as hortaliças não são consumidas in natura.

Ambos os vegetais estão presentes na Tabela de Composição de Alimentos(19), juntamente ao teores de Cálcio, Magnésio, Manganês, Fósforo, Ferro, Sódio, Potássio, Cobre e Zinco correspondentes.

## **2. MACRO E MICROMINERAIS NO CORPO HUMANO**

Os lipídios, proteínas e carboidratos são considerados macronutrientes, pois são consumidos e absorvidos em maior quantidade pelo organismo humano para manter o metabolismo com um bom funcionamento.

Os micronutrientes são componentes dietéticos essenciais e desempenham um papel fundamental na prevenção de doenças, trinta deles são essenciais e não podem ser sintetizados pelo organismo, desta forma a obtenção deles através da alimentação se torna crítica. Os micronutrientes têm uma série de funções bioquímicas que são fundamentais na regulação homeostática da função corporal (20), devido a cada nutriente participar de forma diferente desse mecanismo, a carência pode causar diversos problemas e dificultar o metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas.

De forma mais específica, os minerais, objetivo do estudo deste trabalho, são uma subcategoria dos micronutrientes e são elementos indispensáveis para manutenção da vida animal, regulando mecanismos importantes, participando de processos como o equilíbrio ácido-base, metabolismo, fluxo osmótico e estímulos nervosos. Sendo agrupado em: macrominerais, devendo ser consumidos numa porção acima de 100 mg/dia, tais como cálcio, fosforo, magnésio, potássio e sódio e os microminerais, entre 1 a 50 mg/dia, como cobre, flúor, ferro, manganês, molibdênio, selênio e zinco.

Aquém dos macros e micronutrientes, na alimentação alguns elementos não possuem função biológica e são considerados tóxicos mesmo em baixas concentrações. O bário, por exemplo, é um metal considerado tóxico e pode ser

incorporado na estrutura de alguns vegetais a depender da estrutura do solo em que foi realizado o plantio ou proveniente da água utilizada na irrigação.

Segue alguns minerais que foram objetivos de estudo neste capítulo, bem como suas funções no organismo.

**Quadro 1** – Minerais e suas funções no organismo (continua)

Mineral	Função	Referência
Ba	Não apresenta função do organismo e é considerado tóxico em certos níveis.	(21)
Ca	Possui uma série de papéis biológicos, incluindo processos estruturais e metabólicos chave, como contração muscular, digestão, coagulação do sangue e sinalização celular.	(22)
Fe	Centro ativo de proteínas, responsável pela transferência de oxigênio e elétrons em metaloenzimas como oxidases e desidratases.	(23)
K	Desenvolvimento fisiológico celular e na regulação dos fluidos corporais, juntamente com o cloro	(24)
Mg	Atua como cofator de mais de 300 enzimas, estabiliza proteínas e membranas, e regulação de fluxos iônicos.	(25)
Na	Manutenção do volume e da osmolaridade. Ele também contribui para a manutenção do equilíbrio ácido-básico, a absorção de nutrientes e é essencial para a contração muscular e transmissão nervosa.	(26)
P	Exerce papel estrutural, uma vez que está presente na composição da membrana celular por meio de sua combinação com lipídeos, formando os fosfolipídeos.	(27)
S	Possui funções energéticas, plásticas e de desintoxicação, está presente na constituição de todas as proteínas celulares.	(28)
Zn	Incorporado em enzimas, ligando-se ao DNA e regulando a transcrição de receptores para hormônios esteroides e outros fatores.	(20)

Fonte: Própria (2019)

(final)

### 3. INFLUÊNCIA DO MÉTODO DE COZIMENTO

Cozer um alimento significa prepará-lo por meio do fogo e este tratamento térmico pode ter um impacto positivo (destruição de patógenos e inativação de enzimas indesejáveis) ou negativo (perdas de nutrientes). As condições de processamento podem causar perdas de vitaminas, que variam de acordo com o método de cozimento e o tipo de alimento. A degradação de vitaminas depende de condições específicas durante o processamento, tais como temperatura, presença de oxigênio, luz, pH, umidade e duração do tratamento térmico (29).

No caso das hortaliças que podem ser consumidas cruas ou cozidas, a depender do consumo escolhido, a biodisponibilidade de nutrientes (como fitoquímicos, vitaminas, minerais e fibras) pode ser alterada. Algumas evidências sugerem que para alguns nutrientes, como o licopeno e o caroteno, o cozimento pode aumentar sua biodisponibilidade. Porém, o tipo de processamento também pode levar a perdas de minerais, seja cocção, secagem, cortes e congelamento.

Prodanov e colaboradores (2004) (30), estudaram a influência de imersão e cozimento nos teores de tiamina, riboflavina e niacina de leguminosas, como, feijão, grão de bico e lentilha. O procedimento baseou-se em cozinhar essas leguminosas durante 35 minutos e depois de secas, liofilizadas e homogeneizadas os componentes foram determinados por HPLC. Os resultados indicaram que houve perda desses nutrientes se comparado as amostras naturais, tanto no método de imersão quanto no cozimento.

Outro autor que estudou a relação entre os métodos de cozimento e as propriedades nutricionais, foi Zhong (2015) (31), no qual comparou o efeito do micro-ondas usando saco a vapor versus métodos de cozimentos tradicionais na *Brassica oleracea* (brócolis). Essas descobertas mostraram que a confecção de recipientes a vapor ajuda a aumentar o conteúdo nutricional, e produz alterações de cor mínimas, diminuindo o ácido ascórbico, mas aumentando a capacidade antioxidante total, trazendo o indicativo de que cozinhar vegetais a vapor é uma forma de manter a qualidade nutricional.

Em 2015, Bureau e colaboradores (32) fizeram um estudo mais completo, comparando quatro métodos de cozimento: ferver em água, cozinhar com vapor,

cozinhar a pressão e cozinhar em micro-ondas, em treze vegetais: 3 tipos de feijão francês, ervilha, couve de Bruxelas, brócolis, couve-flor, alho-poró, abobrinhas, ramos, espinafre, cogumelo, cenoura e planta de ostra. Eles destacam que a característica nutricional para cada método depende do vegetal, sendo que no geral o cozimento por micro-ondas ou por pressão pode ser o melhor método para preservar a qualidade nutricional. Porém, a ausência de resultados gerais para todos os componentes e todos os vegetais (com exceção da fervura) geram uma dificuldade em dar uma recomendação real simples para melhor preservar a qualidade nutricional dos vegetais congelados.

Muito além da análise de características relacionadas a componentes orgânicos, muitos autores analisaram a composição mineral de diferentes tipos de hortaliças. Santos e colaboradores (2013) (33), determinaram seis elementos: Fe, Zn, K, Ca, Mg e Na, em amostras de brócolis coletadas em diferentes cidades do estado da Bahia, ademais comparou-se os teores de minerais em amostras cruas e cozidas. Os resultados obtidos mostraram que os elementos determinados tiveram seus níveis diminuídos à medida que os brócolis foram cozidos em relação ao cru, sendo o provável motivo à perda por lixiviação.

O estudo supracitado é diferenciado, pois apresenta inclusive o uso de técnicas de análise multivariada, como o PCA e o HCA, nos quais trazem a informação da tendência de separação entre as amostras cruas e cozidas, exemplificado graficamente através dos gráficos das PC's e do dendrograma, corroborando com o que já havia sido observado através da análise dos dados individuais.

A manutenção das quantidades minerais é um desafio, uma vez que, logo após a colheita, reações químicas e físicas passam a ocorrer e podem influenciar na qualidade, sendo que os principais determinadores das perdas são os métodos de cocção, pois a temperatura, o tempo e o tipo de cocção influenciam diretamente na quantidade final destes nutrientes (34).

Sabe-se que o processo de cozimento envolve mudanças na estrutura das folhas devido ao efeito do calor e essas reações são em geral de caráter físico-químico. A temperatura empregada, no caso de cocção, é um fator crucial e está relacionado intrinsecamente a perda dos nutrientes, modificando assim as propriedades nutricionais. Desta forma, vale ressaltar que vegetais da mesma espécie podem

apresentar composições químicas diferentes, devido a fatores ambientais, variabilidade do solo e período da colheita. Essas variações influenciam diretamente na interação desta amostra com o método de cozimento, pois cada processo interage de forma diferente com a estrutura do vegetal.

#### **4. AVALIAÇÃO QUÍMIOMÉTRICA – MÉTODOS NÃO-SUPERVISIONADOS**

Os métodos quimiométricos podem ser aplicados em dados multivariados com os propósitos qualitativos (análise exploratória e reconhecimento de padrões) e quantitativos (calibração). Estes métodos possibilitam encontrar e/ou prognosticar uma propriedade de um conjunto de amostras, a qual não é diretamente mensurável, mas que se relaciona com as medidas analíticas que são obtidas (35).

Os métodos não supervisionados de análise consistem em técnicas multivariadas que mostram tendências de separação, viabilizando a obtenção de informações (36).

O número de parâmetros analisados (variáveis) nos estudos de reconhecimento de padrões é elevado, e a representação gráfica de todo o conjunto de dados facilita a interpretação dos resultados. Alguns algoritmos foram desenvolvidos para elaborar gráficos que representem a maior quantidade possível das informações contidas em um conjunto de dados analíticos.

Esses métodos são denominados de não supervisionados, pois a princípio não se conhece as classes a quais os objetos (amostras) pertencem ou essa interpretação não é fornecida na hora de construir o modelo matemático. Destacam-se a análise de componentes principais (PCA) e a análise por agrupamento hierárquico (HCA).

O objetivo desses métodos são reduzir a dimensão dos dados, avaliar e organizar, sendo que esses dados podem ser de caráter contínuo, como dados espectroscópicos, cromatogramas e infravermelho, e discretos, como concentração (devido a algumas limitações instrumentais), dentre outros. Esses métodos se baseiam nas seguintes suposições (35):

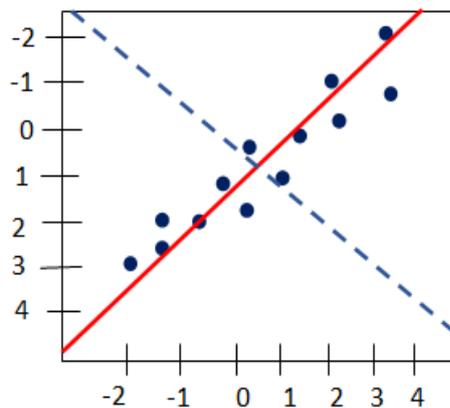
- As amostras do mesmo tipo são semelhantes;
- Existem diferenças significativas entre diferentes tipos de amostras;

- O conjunto de medidas disponíveis é capaz de detectar essas semelhanças e diferenças.

Com base nos padrões observados e obtidos é possível chegar a conclusões, como a possível adulteração de remédios (37) ou avaliação de contaminantes em diferentes legumes (38), indicando uma gama de aplicações possíveis.

#### 4.1. ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)

A análise das componentes principais (PCA) é uma maneira de identificar a relação entre características extraídas de dados. É utilizada quando os vetores de características (variáveis) têm muitas dimensões ou quando uma representação



gráfica não é possível, porém pode ser utilizado com dimensões menores.

A componente principal é o vetor que melhor representa a distribuição dos dados no espaço (reta vermelha) e a componente secundária (reta azul) é ortogonal a componente principal.

**Figura 1** - Representação Gráfica das componentes principais

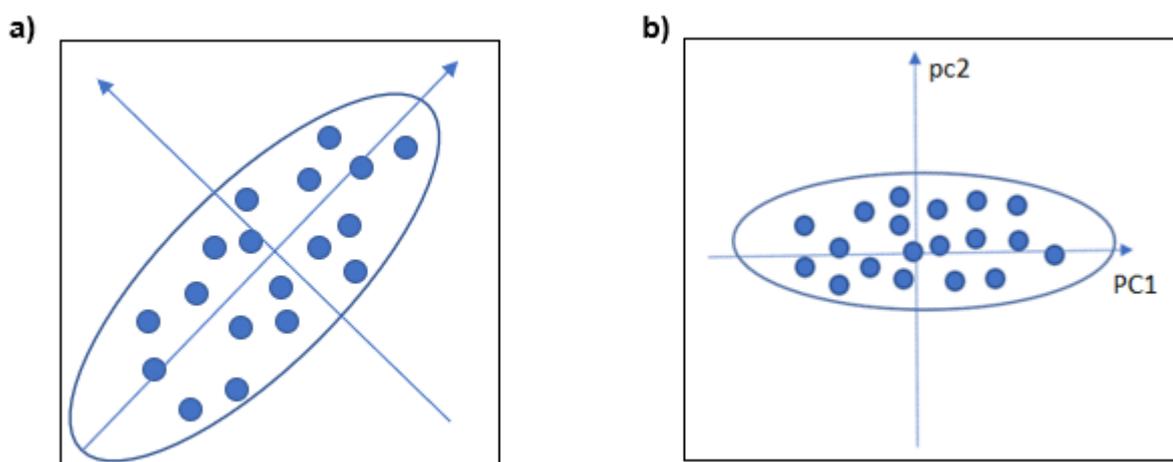
Fonte: Própria (2018)

Usando o exemplo genérico acima, podemos observar que a distribuição dos dados (representados pelos pontos azuis), indica que podemos expressar a distribuição dos dados na PC1 (em vermelho), pois representa a maior variabilidade desses dados a segunda componente principal, representaria a maior variabilidade subsequente a PC1 e assim sucessivamente até que se esgote 100% da variabilidade.

As componentes principais comprimem os dados reduzindo o número de variáveis e facilitando a análise. Cada componente principal será formada pelas variáveis originais que combinadas representaram toda a matriz de dados.

Desta forma, cada componente principal será definida por um par de vetores pesos e escores. Pode-se interpretar também os pesos como os ângulos do vetor direção e os escores como a projeção das amostras em direção das PC's. Ocorre então, uma mudança do espaço tridimensional em "n" direções, direções essas que numericamente equivalem a quantidade de variáveis em estudo (Figura 2).

**Figura 2 - conjunto** de dados originais, b) conjunto de dados após PCA



Fonte: Própria (2018)

O número de PC's utilizadas para representar corretamente os dados depende do gráfico de autovalores e de quantas PC's são necessárias para representar a variabilidade do sistema sem perda de informação.

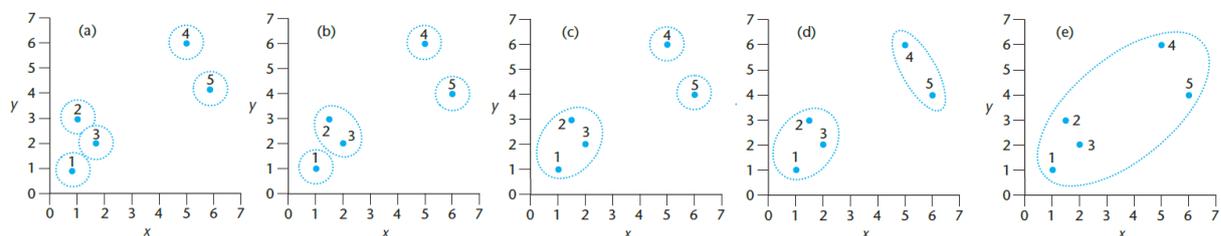
#### **4.2. ANÁLISE DE COMPONENTES HIERÁRQUICOS (HCA)**

A Análise de agrupamento hierárquico (HCA) é um método para dividir um grupo de objetos, caso forem similares estarão na mesma classe. A intenção é que haja homogeneidade dentro as classes e heterogeneidade entre as classes.

Diferente das componentes principais, a análise de agrupamento hierárquico, visa diminuir o número de objetos e não o número de variáveis, concentrando-os em um número menor de grupos (40). Esta classificação é baseada na distância entre pares

de amostras em um espaço n-dimensional. Quanto menor a distância entre as amostras, maior a similaridade entre elas.

**Figura 3 – Estágios de formação dos clusters**

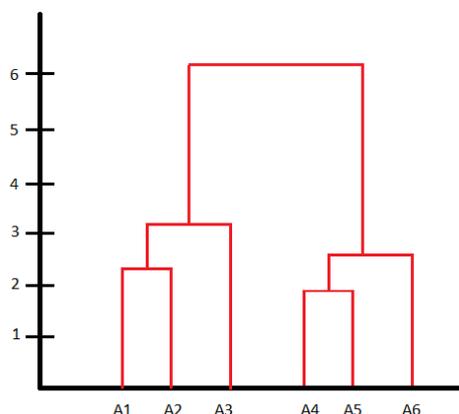


Fonte: Miller, J. C. e Miller, J. N., *Statistic and Chemiometrics for Analytical Chemistry*, 6ª ed, 2010.

A figura 4, indica como ocorre o processo de busca da similaridade, individualmente as amostras são observadas no espaço, considerando-as um agrupamento separado, em seguida se calcula as similaridades (pelo cálculo de distância) entre os pares como mostra a letra b). E assim sucessivamente até que todas as amostras sejam contempladas em um grupo único que contenha todas as amostras. Este caso, presume um processo aglomerativo.

As amostras similares são representadas em duas dimensões num dendrograma (Figura 4). O dendrograma é um gráfico bidimensional que sintetiza as informações e mostra a proximidade das amostras versus a similaridade, pode ser representado de forma vertical ou horizontal, apesar de ser mais utilizado para exemplificar a relação entre as amostras, as variáveis também podem ser correlacionadas.

**Figura 4 – Representação do dendrograma**



Fonte: Própria (2018)

## 5. AVALIAÇÃO QUÍMIOMETRICA – MÉTODOS SUPERVISIONADOS

Diferentemente dos métodos não supervisionados que mostram tendências, o método de reconhecimento de padrões ou método supervisionado são utilizados para identificar diferentes tipos de amostras através das semelhanças e diferenças entre elas. Para isso é importante ter conhecimento das características que possam distinguir esses diferentes tipos de amostras.

Cada amostra diferente teoricamente pertencerá a uma classe diferente, o conjunto de medidas experimentais é chamado de padrão e são classificados de acordo com a propriedade de interesse. Atribuir essa propriedade a uma amostra e conseqüentemente a uma classe é denominada reconhecimento (46). As medidas utilizadas para a construção das classes resultam em um modelo matemático de classificação que classificará futuras amostras desconhecidas.

As técnicas de classificação são categorizadas de acordo com suposições usadas na construção dos modelos, elas podem ser:

### 1. Paramétricas e não paramétricas:

O modelo paramétrico ou clássico emprega parâmetros, como média e matriz de covariância, para definir as regras do classificador para cada classe, o que demanda certa homogeneidade nas propriedades espectrais das classes(35), como o SIMCA e o LDA. Já as não-paramétricas não consideram informação da distribuição da população como no caso anterior, elas deixam os próprios dados definirem sua própria estrutura, como o KNN.

### 2. Discriminantes e Modelativas:

No modelo discriminante as amostras pertencem a somente uma classe, como no caso do KNN e o LDA. Já no caso das modelativas, as amostras podem pertencer a nenhuma classe, uma ou várias classes ao mesmo tempo, pois as fronteiras podem se sobrepor, como o SIMCA.

### 3. Probabilísticas e Determinísticas:

Os modelos considerados probabilísticos estimam um grau de confiança da classificação, no segundo caso, não se estima um grau de confiança na classificação.

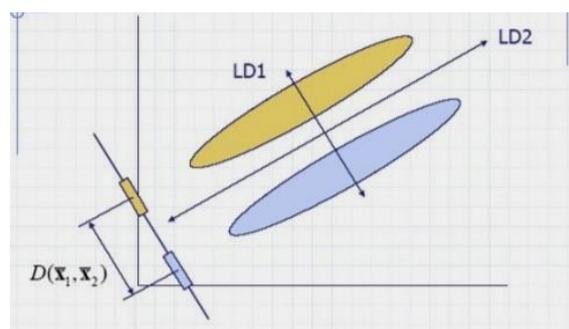
Por apresentar uma gama de possibilidades, os métodos supervisionados são aplicados em diferentes situações, por exemplo: identificação de espécies de madeira(47), distinguir metabólitos secundários e divergências filogenéticas (48), detecção de abuso de álcool através de marcadores biológicos (49), classificação de amostras de acordo com sua origem geológica (50–52), dentre outras.

### 5.1. LDA

A Análise de Discriminantes Lineares (LDA) é um método que define uma superfície de separação entre dois grupos considerados distintos, proposto por Fischer, trabalha-se com projeções de amostras para determinar um vetor que melhor discrimine as amostras, através de um critério de maximização da separação entre duas ou mais classes de amostras (53).

Vale ressaltar que diferentes dos outros métodos de análise supracitados o LDA, discrimina dois grupos construindo uma fronteira em linha reta (Figura 8), com isso o método tenta encontrar a melhor maneira de projetar as classes num plano de forma que apresentem a melhor separação interclasses.

**Figura 5 – Representação gráfica dos limites lineares**



Porém, para que o método de classificação seja bom, os erros devem ser considerados ou até mesmo previstos, com isso se reduz a probabilidade de má classificação.

É um dos métodos mais simples de se aplicar, porém apresenta algumas desvantagens como: ser somente aplicado quando o número de variáveis é menor

que o de objetos, assumir que as classes são linearmente separadas, sendo que muitas vezes a realidade é outra, sensível a outliers e dificuldade quando o número de classes a se distinguir é muito grande.

Baseando-se na Função Discriminante Linear de Fischer, uma combinação linear que tem como intuito produzir uma separação máxima entre duas populações  $b$ . Considerando que  $\mu_i$  e  $S^{-1}$  são parâmetros conhecidos e respectivamente, os vetores de médias e a matriz de covariâncias comum das populações  $\pi_i$ . Demonstra-se que a função linear do vetor aleatório  $X$  que produz separação máxima entre duas populações é dada por (54):

$$D(X) = L' \cdot X = [\mu_1 - \mu_2]' \cdot \Sigma^{-1} \cdot X \quad (14)$$

Sendo:

- $L$  = vetor discriminante;
- $X$  = vetor aleatório de características das populações;
- $\mu$  = vetor de médias p-variado;
- $S^{-1}$  = matriz comum de covariâncias das populações  $\pi_1$  e  $\pi_2$ ;

O valor do Discriminante de Fischer é dado pela equação:

$$D(x_o) = [\mu_1 - \mu_2]' \cdot \Sigma^{-1} \cdot x_o \quad (15)$$

O ponto médio entre as duas médias populacionais  $\mu_1$  e  $\mu_2$  é:

$$m = \frac{1}{2} [\mu_1 - \mu_2]' \cdot \Sigma^{-1} \cdot [\mu_1 + \mu_2] \quad (16)$$

Ou seja,

$$m = \frac{1}{2} [D(\mu_1) + D(\mu_2)] \quad (17)$$

Logo, para que um elemento seja incluído em um grupo ou outro, é:

$$\text{Alocar } x_o \text{ em } \pi_1 \text{ se } D(x_o) = [\mu_1 - \mu_2]' \cdot \Sigma^{-1} \cdot x_o \geq m$$

$$\text{Alocar } x_o \text{ em } \pi_2 \text{ se } D(x_o) = [\mu_1 - \mu_2]' \cdot \Sigma^{-1} \cdot x_o < m \quad (18)$$

Desta forma, podemos assumir que as populações, tem a mesma matriz de covariância sendo possível estimar uma matriz de covariância conjunta.

$$S_c = \left[ \frac{n_1 - 1}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1)} \right] \cdot S_1 + \left[ \frac{n_2 - 1}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1)} \right] \cdot S_2 \quad (19)$$

Portanto, a função discriminante é dada por:

$$\begin{aligned} S_c &= \text{estimativa da matriz comum de covariâncias } S^{-1}; \\ n_1 &= \text{número de observações da população } \pi_1; \\ n_2 &= \text{número de observações da população } \pi_2; \\ S_1 &= \text{estimativa matriz de covariâncias da população } \pi_1; \\ S_2 &= \text{estimativa matriz de covariâncias da população } \pi_2; \\ D(x) &= \hat{L}' \cdot x = [\bar{x}_1 - \bar{x}_2]' \cdot S_c^{-1} \cdot x \end{aligned} \quad (20)$$

Em que:

$D(x)$  = função discriminante linear amostral de Fischer

$L'$  = estimativa do vetor discriminante;

$X_1$  = média amostral da população  $\pi_1$

$X_2$  = média amostral da população  $\pi_2$

## 5.2. AVALIAÇÃO DO MODELO SUPERVISIONADO DE ANÁLISE

Para avaliar se a construção do modelo criado é adequada se faz necessário avaliar determinados parâmetros como: especificidade, sensibilidade, falso positivo e exatidão.

Para isso, utiliza-se a tabela de contingência, também chamada de matriz de confusão, com o intuito de representar a quantidade de amostras que forma classificadas em casa classe, a partir dela, é possível extrair as figuras de mérito. A sensibilidade expressa quão bem o modelo é capaz de classificar as amostras corretamente nas classes, já a seletividade informa as amostras que não foram classificadas numa determinada classe de forma correta. Já, a taxa de falso positivo indica as amostras que foram classificadas de forma equivocada em uma classe que não há pertence, e o falso.

## **6. DETERMINAÇÃO DE MINERAIS POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO (ICP-OES)**

Existem diferentes técnicas sequenciais e multielementares que podem ser utilizadas para determinar diferentes analitos, como o GFAAS, FAAS e frequentemente o ICP-OES e o ICP-MS.

Técnica utilizada, nessa tese, o ICP-OES possui uma fonte de plasma baseada na excitação de átomos que alcança altas temperaturas e a amostra ao ser nebulizada passa por três etapas: dessolvatação, vaporização e pôr fim a excitação (55).

O ICP-OES é considerado uma escolha viável para determinar metais em diferentes matrizes pois é uma técnica consolidada, robusta, com boa reprodutibilidade e alta sensibilidade, na faixa de  $\text{mg L}^{-1}$  e alguns elementos na faixa de  $\mu\text{g L}^{-1}$ , além de uma boa linearidade. Porém, apresenta algumas limitações, como efeitos de matriz consideráveis e interferências químicas e espectrais.

Devido a estas características, Naghipour e colaboradores (2018), fizeram uso do ICP-OES para determinar metais pesados (Cd, Pb, Cu, Ba, Co e Sn) em amostras de frutas e vegetais, vale ressaltar que por se tratar de amostras sólidas, fez-se necessário uma etapa de preparo da amostra através da decomposição por via úmida utilizando ácido nítrico, demonstrando uma das limitações desta técnica quando relacionada ao estado físico que se apresenta a amostra.

Tratando-se da determinação de minerais em amostras de hortaliças o Quadro 2 traz um compilado de alguns artigos encontrados na literatura, indicando o uso desta técnica como uma alternativa viável para a determinação de minerais em amostras semelhantes.

**Quadro 2** – Determinação de minerais em amostras de vegetais usando ICP-OES

Amostra	Elementos determinados	Referências
Folhas de rabanete, rabanete, salsinha, espinafre, cebolinha, alho-poró, hortelã, coentro	Ba, Cd, Co, Pb, Cu, Sn	(56)
Couve	Ca, Fe, Fe, Mg, Zn	(57)
Brócolis	Ca, Fe, Mn, K, Mg, Na e Zn	(33)
Variedades da família Brassicaceae	Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn	(58)

Agrião	Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn	(59)
--------	----------------------------	------

## **7. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS**

Uma série de parâmetros são avaliados para que um método específico seja considerado adequado a ser aplicado em determinadas amostras, com isso uma gama de requisitos é calculada, com o propósito de validação.

### **7.1. LIMITE DE DETECÇÃO (LD) e QUANTIFICAÇÃO (LQ);**

Considerados parâmetros importantes de qualquer método analítico a ser desenvolvido, o limite de detecção é a concentração na qual é possível diferenciar o branco do sinal do analito, identificando a presença ou não dele.

Já o limite de quantificação é a concentração mínima na qual o analito em questão é quantificado com exatidão, garantindo a confiabilidade da resposta analítica gerada.

A IUPAC (60) recomenda expressá-lo matematicamente como três vezes o desvio padrão do valor do sinal analítico correspondente ao branco ( $s$ ) obtido de 20 a 30 determinações, dividido pela inclinação da curva analítica ( $S$ ). De acordo com as equações:

$$LD = \frac{3s}{S} \quad (21)$$

$$LQ = \frac{10s}{S} \quad (22)$$

## 7.2. SENSIBILIDADE E LINEARIDADE

A sensibilidade está relacionada com a capacidade de o método distinguir, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas. Métodos considerados sensíveis indicam que uma pequena diferença na concentração do analito resulta numa grande variação do sinal analítico medido.

Já, a linearidade é a capacidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras em uma dada faixa de concentração, frequentemente expressa através do coeficiente de correlação,  $R$ , e do coeficiente de determinação,  $R^2$ . Contudo, valores de  $R$  próximos de 1 não implicam necessariamente que a curva analítica apresenta linearidade satisfatória.

## 7.3. FAIXA LINEAR DE TRABALHO

A faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio será utilizado, nesse caso, o valor inferior corresponde ao limite de quantificação e o superior, corresponde até a concentração na qual a curva analítica permanece linear. Para qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentração do analito ou valores da propriedade no qual o método pode ser aplicado (61).

## **7.5. PRECISÃO**

Indica a dispersão dos resultados em análises de amostras num curto período de tempo, com o mesmo operador, mesmo instrumento, no mesmo laboratório. Nesse caso, também denominado repetibilidade.

Quantitativamente avaliada através do desvio padrão associado à média de um conjunto de ensaios independentes, sendo expressa como desvio padrão relativo (RSD)

$$RSD=(s/x)\times 100\% \quad (23)$$

Onde x é o valor médio do conjunto de resultados e s é o desvio padrão associado.

## **7.6. EXATIDÃO**

Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. Geralmente é avaliada através de ensaios de fortificação (adição e recuperação) e/ou Materiais Certificados de Referência (CRM).

O uso do CRM é mais adequado pois as concentrações são certificadas e referidos com incerteza, sendo possível realizar testes estatísticos de exatidão (teste t) e teste de precisão (teste F). Porém há casos em que o uso do teste de fortificação se faz necessário, pois não existe CRM de matriz semelhante a amostra em estudo. A exatidão foi avaliada utilizando o material de referência certificado de folhas de maçã (NIST 1515) obtido através do National Institute of Standard Technology.

## **8. PARTE EXPERIMENTAL**

### **8.1. COLETA DAS AMOSTRAS**

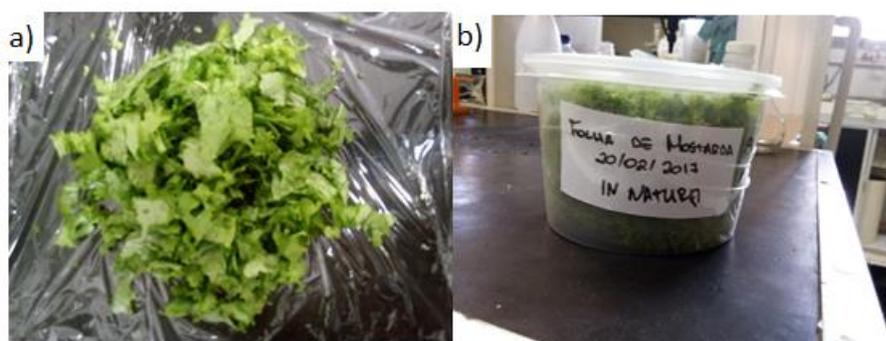
As amostras de Mostarda foram coletadas de fevereiro a junho de 2017, em supermercados e feiras nas cidades de Salvador, Serrinha, Berimbau e Feira de Santana, Bahia. Já, as amostras de Chicória foram coletadas entre março e setembro de 2018 somente em supermercados da cidade de Salvador, Bahia.

## 8.2. PRÉ-TRATAMENTO

As amostras de mostarda e chicória, após a coleta, foram higienizadas com uma solução de Extran a 2% v/v por 15 minutos com o objetivo de remover as impurezas e resíduos de possíveis agrotóxicos. Em seguida, foram lavadas com água ultrapura e secas com papel toalha.

Sobre um papel filme, a fim de evitar contaminações, as amostras foram cortadas com garfos e facas de plásticos (Figura 9a), homogeneizadas, rotuladas e em seguida armazenadas em recipientes de plásticos descontaminados (Figura 9b) até serem levadas para balança e seguirem com os procedimentos de preparo de amostra.

**Figura 6-** Preparo das amostras, a) aspectos da amostra pós corte e b) recipiente de armazenamento.



Fonte: Própria (2017)

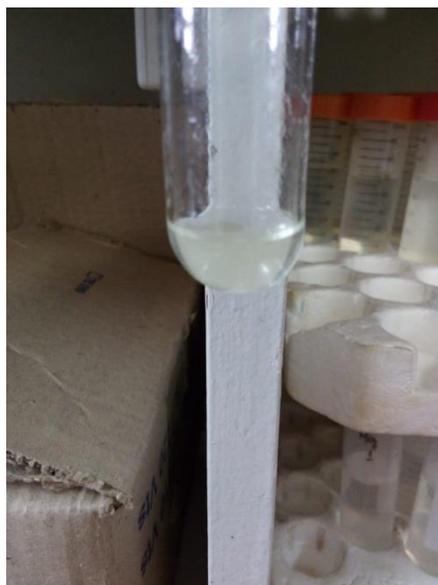
## 8.3. PROCEDIMENTO DE DIGESTÃO DAS AMOSTRAS

O bloco digestor com o uso de dedo frio foi escolhido por ser um sistema de digestão por via úmida, logo ocorre a mineralização das amostras sendo possível sua determinação por ICP-OES

Sendo assim, aproximadamente 2 g de amostras foram pesadas e digeridas em 4 mL de ácido nítrico e 1 mL de peróxido de hidrogênio adicionado 1h após o início da digestão. O tempo total desse processo foi de duas horas. No caso da chicória, foram utilizados 3 mL de ácido, mantendo todos os outros parâmetros iguais.

A diferença entre os volumes de ácido utilizados pode ser explicada pela diferença no teor de fibras encontradas em cada hortaliça, sendo uma relação diretamente proporcional, ou seja, quanto maior o teor de fibras, maior a quantidade de ácido usado para facilitar a digestão, uma vez que a chicória apresenta 3 g/100 g de fibras e a mostarda 4g/100g. Além disso, o aspecto visual do digerido, no caso da mostarda, foi um fator determinante para o aumento do volume do uso de ácido na digestão, como pode-se observar na figura 11, já que um dos indícios de uma digestão completa é a limpidez do digerido, algo que não foi atingido ao utilizar menores volumes de ácido. Foram pesados aproximadamente 2g de amostras e em seguida a digestão prosseguiu com 4 mL de ácido nítrico e 1 mL de peróxido de hidrogênio, ao qual foi colocado uma hora após o início da digestão à temperatura de 145°C e duração total de 2h.

**Figura 7** - Aspecto da amostra digerida com menor volume de ácido



Fonte: Própria (2017)

Após a digestão as soluções foram transferidas para um tubo de polietileno e diluídas para 15 mL com água ultrapura. Cada amostra foi realizada em triplicata, bem como o branco.

Os volumes escolhidos tanto para o ácido, peróxido e o tempo da digestão foram corroborados em artigos já encontrados na literatura (62,63) que usam esses valores

em matrizes semelhantes, portanto não se considerou necessário esse tipo de monitoramento.

O procedimento descrito acima foi realizado para todas as amostras que passaram pelo processo de cocção.

#### **8.4. SISTEMA E METODOS DE COCÇÃO EMPREGADOS**

Foram avaliados três sistemas de cocção diferentes: cozido em fogão convencional, uso do micro-ondas e cozimento em vapor (Figura 8), comparados com a amostra crua, todos com o aproximadamente 2g de amostra e realizados em triplicata.

**Figura 8** – Aparato para cozimento em vapor



Fonte: Própria (2017)

Vale ressaltar que todo o material usado era de laboratório e devidamente higienizado para evitar contaminação. A cocção das hortaliças foi realizada no laboratório do Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia.

Por não haver um tempo de cozimento estabelecido para a mostarda e a chicória, tomou-se como referência a metodologia descrita por Botelho (2005) para alimentos semelhantes (64). No caso da mostarda, hortaliças da família Brassicaceae e no caso da chicória hortaliças da família Asteraceae.

**Quadro 3 – Metodologia de cocção empregados**

Tratamento	Tempo médio (min)	Volume de água (mL)
Fogão convencional	15 <sup>a</sup> -20 <sup>b</sup>	50
Micro-ondas*	5 <sup>a,b</sup>	50
Vapor	15 <sup>a</sup> -20 <sup>b</sup>	50

<sup>a</sup>folhas de chicória, <sup>b</sup> folhas de mostarda

\*utilizada potência máxima

O tempo de cocção era contado a partir do momento que a água entrava em ebulição. E o tempo em micro-ondas era contado de acordo com o timer do próprio eletrodoméstico.

## 8.5. INSTRUMENTAL

A determinação de elementos químicos: potássio, cálcio, sódio, ferro, fósforo, magnésio e enxofre foi realizada empregando-se um espectrômetro de emissão óptica de plasma indutivamente acoplado com visualização axial - ICP OES (Vista Pro Varian, Mulgrave, Austrália). Os parâmetros instrumentais estão descritos na tabela 1. Também foram utilizadas a balança analítica SARTORIUS, modelo BLD105 e bloco digestor modelo TE-040/25 (TECNAL, São Paulo, Brasil) com controle de temperatura.

**Tabela 1 – Parâmetros instrumentais do ICP OES**

Parâmetros	Valor/Especificação
<b>RF gerador de frequência (MHz)</b>	40
<b>RF potência (kW)</b>	1.0
<b>Vazão do plasma (L min<sup>-1</sup>)</b>	15
<b>Vazão do gás auxiliar (L min<sup>-1</sup>)</b>	1.5
<b>Pressão do nebulizador (KPa)</b>	200
<b>Sistema de nebulização</b>	V-Groover com câmara de spray de PTFE Sturman-Masters
<b>Linhas espectrais selecionada (nm)</b>	K II (766.491), Ca II (317.933), Na I (589.592), Fe II (238.204), P I (213.613), Mg II (285.213), e S II (181,972).

---

## 8.6. REAGENTE E SOLUÇÕES

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico (Merck, Darmstadt, Alemanha), sendo que as soluções analíticas de referência dos elementos químicos foram preparadas, antes da utilização por diluição seriada de soluções de referência estoque com concentrações de 1000 ou 4000 mg L<sup>-1</sup>. Todas as soluções foram preparadas utilizando água ultrapura obtida de um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, EUA).

O material de referência certificado de folhas de maçã NIST 1515 fornecido Institute of Standard and Technology (Gaithersburg, MD, USA) foi utilizado para os testes de validação.

## 9. PARÂMETROS ANALÍTICOS

Os parâmetros analíticos foram realizados de acordo com os procedimentos descritos no tópico 7, e foram analisados a sensibilidade, precisão, limite de detecção e quantificação e exatidão.

### 9.2. LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

O limite de detecção e quantificação foi obtido de acordo com as orientações do IUPAC, na qual foi realizada análise de dez brancos analíticos, de acordo com as equações 21 e 22. Para cada elemento foram obtidos valores de LD E LQ diferentes, de acordo com a tabela abaixo.

**Tabela 2** – Valores de LD E LQ para as amostras de folha de mostarda e chicória

Elemento	Folha de mostarda		Folha de Chicória	
	Limite de detecção (mg kg <sup>-1</sup> )	Limite de Quantificação (mg kg <sup>-1</sup> )	Limite de detecção (mg kg <sup>-1</sup> )	Limite de Quantificação (mg kg <sup>-1</sup> )
Ba	0,02	0,07	0,02	0,07
Ca	3,14	10,36	0,16	0,53
Fe	0,04	0,13	0,19	0,63

K	2,56	8,45	0,23	0,76
Mg	1,26	4,16	0,22	0,73
Na	6,77	22,34	0,1	0,33
P	0,06	0,19	0,02	0,08
S	0,62	2,06	0,09	0,31
Zn	0,19	0,62	0,02	0,07

### 9.3. SENSIBILIDADE, FAIXA DE TRABALHO E LINEARIDADE

A faixa linear de trabalho se inicia no limite de quantificação do analito e termina no ponto final da curva de calibração. Enquanto no caso da linearidade é necessário conhecer a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito, obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real (61).

**Tabela 3** – Valores de sensibilidade, faixa linear e coeficiente de determinação para os analitos determinados nas folhas de mostarda e chicória

Elemento	Folha de mostarda			Folha de chicória		
	Sensibilidade (L mg <sup>-1</sup> )	Faixa linear (mg L <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	Sensibilidade (L mg <sup>-1</sup> )	Faixa linear (mg L <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
Ba	591679	0,08 - 40	0,9986	591679	0,048 - 70	0,9995
Ca	595427	10,47 - 60	0,9961	595427	0,531 - 60	0,9973
Fe	2864,7	0,12 - 20	0,9976	2864,7	0,61 - 20	0,9942
K	5957,4	8,52 - 100	0,9978	5957,4	0,764 - 150	0,9937
Mg	63042	4,2 - 40	0,9992	63042	0,73 - 40	0,9897
Na	21701	22,55 - 150	0,9977	21701	0,014 - 100	0,9982
P	73,313	0,19 - 150	0,9986	73,313	0,08 - 150	0,9976
S	66,646	2,06 - 20	0,9946	66,646	0,307 - 20	0,9984
Zn	10693	0,62 - 20	0,9988	10693	0,065 - 20	0,9882

A sensibilidade é considerada satisfatória, bem como a faixa linear de trabalho, pois todos os analitos medidos nas amostras, ainda que utilizando os métodos de cocção, estão dentro da faixa de trabalho, garantindo a segurança da medida obtida pelo método. Os coeficientes de determinação (R<sup>2</sup>) variaram entre 0,98 e 0,99, valores considerados adequados e dentro dos parâmetros estabelecidos pelo INMETRO, acima de 0,90.

### 9.4. PRECISÃO

Na tabela 6, constam os valores de precisão para cada analito, referente a cada amostra analisada. A precisão do método foi calculada através do desvio padrão relativo (DPR), pelo processo de repetibilidade, realizando dez repetições do ponto intermediário da faixa de trabalho.

**Tabela 4** – Valores de desvio padrão relativo, referente a dez repetições.

Elemento	Precisão (%)	
	Folha de mostarda	Folha de chicória
Ba	0,7	4,6
Ca	2,5	2
Fe	8,8	3,7
K	0,2	3,5
Mg	3,7	0,4
Na	8	2,4
P	4,8	2,9
S	4,9	0,4
Zn	3,8	1

De acordo com o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), o critério de precisão está atrelado a concentração do analito, utilizando como base os critérios definidos pela AOAC (*Association of Analytical Chemists*) (75). Como as concentrações variam na faixa de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  a  $500 \text{mg L}^{-1}$  o desvio padrão pode variar de 15 a 1,9%, desta forma, a precisão do método está coerente com o padrão estabelecido para comparação, indicando precisão adequada do método para determinação dos analitos pretendidos.

## 9.5. EXATIDÃO

Para avaliar a exatidão dos resultados encontrados através do método utilizado, fez-se uso do CRM NIST 1515, de folha de maçã, pelo Instituto Nacional de Padrão e Tecnologia. A comparação dos valores encontrados e certificados para cada elemento é realizada com o uso de dois testes estatísticos, primeiramente, o teste F que é feito com o objetivo de comparar as variâncias de dois grupos de dados e em seguida o teste t de student que compara os valores da média, usando como base os graus de liberdade e o intervalo de confiança, considerou-se 95% de intervalo de confiança, com  $\alpha = 0,025$  (bilateral), logo o valor de  $t_{\text{crítico}} = 4,317$ , e o valor de  $F_{\text{crítico}} = 19,000$ . Se o valor  $t_{\text{calculado}} < t_{\text{crítico}}$ , assim como o valor de  $F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$  os dados

são estatisticamente significativos. Os valores de t e F estão compilados na tabela abaixo.

**Tabela 5** - Comparação entre as concentrações dos analitos no material certificado (n=3)

Elemento	Folha de mostarda				Folha de chicória			
	Valor certificado (mg kg <sup>-1</sup> )*	Valor encontrado (mg kg <sup>-1</sup> )	F <sub>calculado</sub>	t <sub>calculado</sub>	Valor certificado (mg kg <sup>-1</sup> )*	Valor encontrado (mg kg <sup>-1</sup> )	F <sub>calculado</sub>	t <sub>calculado</sub>
Ba	48, 8 ± 2.3	46,2 ± 0.5	17,488	-8,188	48,8 ± 2,3	46,0 ± 2,4	0,918	-1,876
Ca	15250 ± 100	15166 ± 200	0,250	-0,727	15250 ± 100	15080 ± 83	1,452	-3,548
Fe	82,7 ± 2.6	84,5 ± 0.9	8,346	3,272	82,7 ± 2,6	83,3 ± 3,0	0,751	0,346
K	16080 ± 210	15914 ± 246	0,729	-1,169	16080 ± 210	16257 ± 75	7,840	4,088
Mg	2710 ± 120	2735 ± 77	2,429	0,562	2710 ± 120	2798 ± 84	2,041	1,815
Na	24,4 ± 2.1	28,1 ± 1.7	1,526	3,770	24,4 ± 2,1	26,5 ± 1,9	1,222	1,914
P	1593 ± 68	1642 ± 42	2,621	2,021	1593 ± 68	1518 ± 100	0,462	-1,299
S	1800	1765 ± 41	-	-1,479	1800	1780 ± 30	-	-1,155
Zn	12,45 ± 0.43	13,82 ± 1.28	0,113	1,854	12,45 ± 0,43	13,1 ± 1,7	0,064	0,662

Os valores de  $F_{\text{calculado}}$  são menores do que o valor de  $F_{\text{tabelado}}$  (19,000) para 2 graus de liberdade correspondentes a cada análise, indicando a confirmação da hipótese nula, logo as variâncias não são estatisticamente diferentes. Com isso, os valores de  $t$  foram calculados, obtendo também valores menores que o  $t$  tabelado (4,30) para 2 graus de liberdade. Dessa forma, os resultados obtidos em ambas as análises não são estatisticamente diferentes. Resultando na validação do método analítico utilizado, confirmando a sua exatidão.

## **10. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Devido ao grande consumo e por ser considerado um alimento de grande valor nutricional, avaliar a composição mineral de diferentes hortaliças é essencial. Para tal, optou-se como forma de preparo de amostras a decomposição por via úmida com o uso de dedo frio, pois por naturalmente a amostra apresentar um teor grande de fibras, sendo majoritariamente orgânico, torna-se necessário a mineralização da amostra para disponibilizar os analitos em soluções aquosas possibilitando a análise por ICP-OES.

Não se fez necessário realizar uma etapa de otimização deste processo, pois há inúmeros artigos que corroboram o uso dos volumes referidos de ácido, peróxido, bem como o tempo de digestão e a massa da amostra (65,66).

Para melhor discussão dos resultados, primeiro serão expostos os dados relacionados a folha de mostarda, e em seguida da folha de chicória, no fim serão discutidos a análise multivariada deste compilado de dados.

### **10.1. COMPOSIÇÃO MINERAL DAS FOLHAS DE MOSTARDA DE ACORDO COM O MÉTODO DE COZIMENTO**

Posterior a etapa de digestão prosseguiu-se para a determinação do analitos através do ICP OES, nos parâmetros já explicitados anteriormente. Os dados obtidos na leitura de 48 amostras estão representados na tabela abaixo:

**Tabela 6** – Comparativo entre amostra de mostarda e a tabela de referência (ug L<sup>-1</sup>)

Elementos	Mostarda	TACO (2011)*
Ba	4,3 ± 38	-
Ca	53 ± 9	68
Fe	0,8 ± 0,2	1,1
K	121 ± 8	364
Mg	33 ± 8	16
Na	18,8 ± 6,3	3
P	33,3 ± 8,1	58
S	80 ± 11	-
Zn	1,3 ± 0,4	0,3

\*Valores de referência.

Comparando os valores encontrados com os apresentados na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (19), os valores de cálcio e ferro são semelhantes, porém o valor de potássio na amostra é três vezes menor, bem como o valor de fósforo, magnésio, sódio e zinco. Já, para o valor de enxofre não há comparativo, pois não se encontra na tabela utilizada como referência.

O potássio foi o nutriente de maior concentração na amostra, estudos como o de Alves et, al (2011) corroboram essa informação, na qual o autor estudou a variação da vitamina C, potássio, fósforo e cálcio em amostras de brócolis, vegetal da mesma família que a mostarda, obtendo resultados semelhantes.

A TACO por ser uma tabela composta por um plano de amostragem e coleta que contempla todas as regiões do Brasil, através de um projeto integrado entre diferentes laboratórios, traz um valor determinado com garantia de sua confiabilidade analítica. Porém, amostras biológicas podem apresentar teores de nutrientes variáveis,

dependendo do tipo de clima, solo, variabilidade, produção, dentre outros. Desta forma, a variação encontrada nem sempre pode ser considerada erro (67).

Isso acontece, pois, o mecanismo de interação entre solo-planta se dá através de quatro processos: absorção, adsorção, fixação e imobilização, desta forma os teores de minerais podem ser explicados pelo tipo de solo, pois os minerais são passíveis de absorção pela planta. Elementos como o cálcio e o magnésio são dependentes do fluxo de massa, que é governado pela presença de água no solo. Já o fósforo, que tem mobilidade limitada no solo devido às fortes reações de sorção nos argilominerais, é dependente da difusão. Uma vez no interior da planta, a dinâmica de redistribuição dos elementos químicos apresenta padrão bem distinto. Resultando em concentrações de minerais

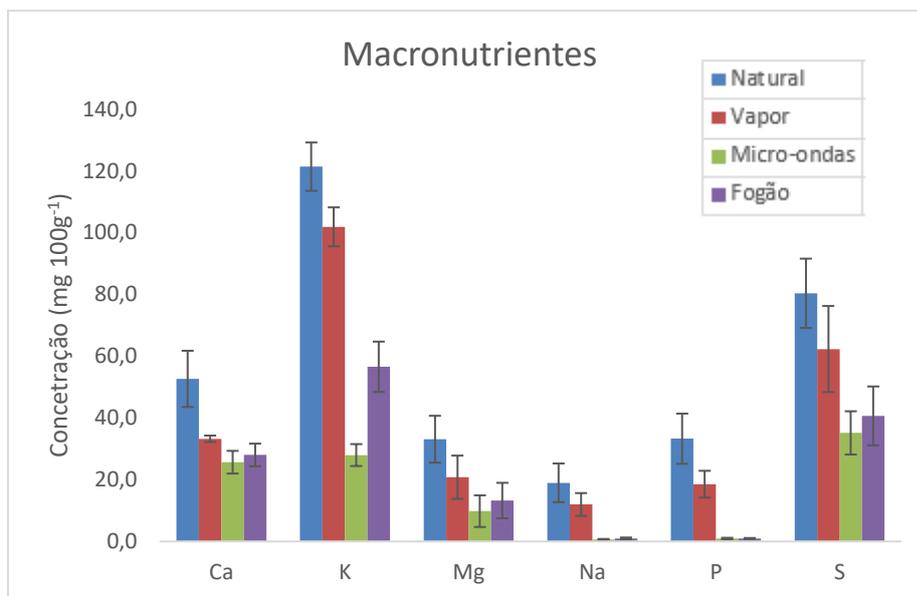
Elementos como o nitrogênio, o potássio e o fósforo são muito móveis e participam da formação de novas estruturas vegetativas (ramos novos e folhas, por exemplo), justificando seus maiores teores em hortaliças folhosas e corroborando com os valores encontrados. Já, o enxofre e o magnésio têm mobilidade intermediária, e o cálcio e o boro são bastante imóveis. A menor mobilidade de elementos no interior da planta faz com que sintomas de deficiência sejam sentidos nas partes mais novas ou na porção superior da planta. A dinâmica dos elementos menores, os chamados microminerais, também segue esse caráter particular de mobilização no solo e translocação no interior das plantas (68).

Dentre os macrominerais, o potássio apresenta maior concentração, corroborando com um estudo realizado em 1978 que estudou a composição de diferentes grupos de hortaliças, totalizando 35 espécies, incluindo hortaliças folhosas do mesmo gênero da mostarda – *Brassica Alba* (69). As hortaliças folhosas tendem a apresentar maiores teores de K, Ca, P, S e por fim Mg.

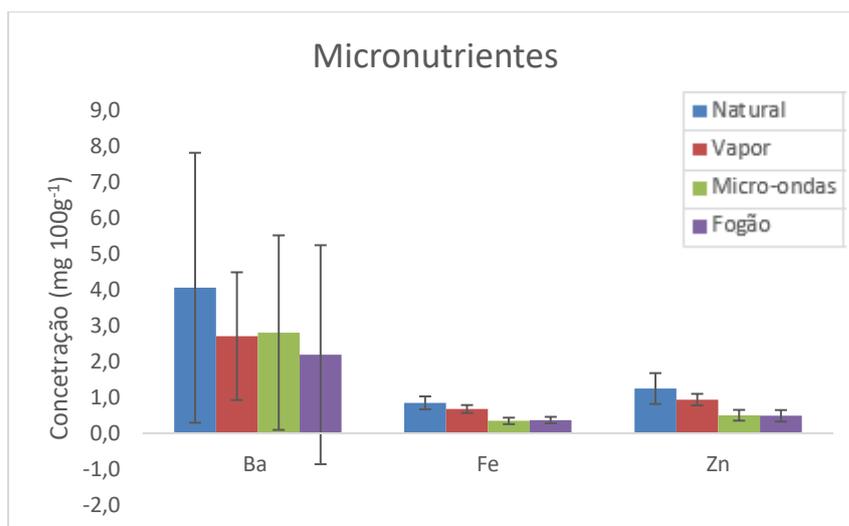
As figuras 9 e 10 trazem a concentração dos analitos nas amostras cruas, comparando-as com as amostras que passaram pelas operações térmicas de

preparo. Foram contrastadas com as amostras cozidas micro-ondas, fogão e vapor. Os resultados correspondem a média da concentração de cada elemento num grupo de doze amostras cada.

**Figura 9** – Gráfico dos teores de macrominerais de acordo com o tipo de processamento térmico em amostras de folhas de mostarda



**Figura 10** – Gráfico dos teores de microminerais de acordo com o tipo de processamento em amostras de folhas de mostarda



Pode-se observar que os valores das amostras cruas são sempre maiores se comparadas as amostras que passam pelos diferentes métodos de cocção, o que já é de se esperar pelo fato de a amostra estar em seu estado natural. Enquanto o uso do forno micro-ondas foi responsável pelas maiores reduções dos nutrientes da amostra na seguinte ordem: sódio; fósforo>potássio>bário; cálcio; ferro; enxofre; zinco>magnésio.

O teor de sódio apresentou ser mais suscetível as perdas do que o potássio, isso pode ser explicado pois, na célula humana, o potássio está presente em maiores quantidades no fluido intracelular, enquanto o sódio é verificado em maior quantidade no meio extracelular. Isso explicaria a maior suscetibilidade da perda de sódio, caso o comportamento fosse semelhante na célula vegetal, porém as hortaliças possuem pouca ou nenhuma quantidade de sódio e esse mineral não é considerado essencial para a sobrevivência dos tecidos vegetais (70).

Os teores de sódio e fósforo foram reduzidos em aproximadamente 96%, o potássio em torno de 76%. A menor perda, ocorreu com o magnésio reduzindo em 33% o seu teor se comparada a amostra *in natura*. Os demais elementos, a redução ficou em torno de 50-60%. De modo geral, o cozimento em micro-ondas apresentou as maiores perdas na seguinte ordem: sódio; fósforo>potássio>bário; cálcio; ferro; enxofre; zinco>magnésio.

Sabe-se que o aquecimento no micro-ondas funciona devido ao processo de irradiação das ondas eletromagnéticas formadas por um dispositivo que converte energia elétrica em micro-ondas, o *magnetron*. Esse aquecimento é devido a interação da onda eletromagnética com o dipolo elétrico da molécula, quando o campo é aplicado as moléculas tendem a se alinhar com o campo, em seguida, quando o campo que provocou a orientação dos dipolos moleculares é removido ocorrerá uma relaxação dielétrica, isto é, as moléculas tenderão a voltar para o estado anterior (menos alinhado), dissipando a energia absorvida na forma de calor (71).

A frequência de radiação do forno de micro-ondas não é igual à frequência de oscilação das moléculas de água, porque se fosse a mesma frequência ela seria totalmente absorvida nas primeiras camadas dos alimentos e a parte interna não seria penetrada, desta forma a frequência escolhida é um meio-termo para que ocorra a penetração tanto nas primeiras camadas do alimento como no seu interior (72).

As propriedades dielétricas da maioria dos materiais biológicos são altamente dependentes do seu teor de água, essa influência deve-se ao valor relativamente elevado da permissividade elétrica relativa da água em relação ao valor correspondente para a matéria seca presente nesses produtos.

Para a indústria alimentícia, por exemplo, as propriedades dielétricas são importantes durante o processamento de alimentos para detectar as condições de processamento e para a determinação e garantia da qualidade dos produtos em processos de cozimento, resfriamento e congelamento. Processos de refrigeração e de cozimento ocorrem principalmente por fenômenos de condução e convecção que dependem principalmente da condutividade, mas também da emissão e da absorção de radiação, portanto características dielétricas são parâmetros importantes a serem considerados.

Segundo Torrão et al (2010) (73), o teor de água afeta significativamente as propriedades dielétricas do alimento e conseqüentemente a profundidade de penetração das micro-ondas. Em alimentos com alto teor de umidade, como no caso da mostarda, a taxa de aquecimento desigual é observada por causa da baixa profundidade de penetração de micro-ondas, por este motivo não há uma correlação que explique as diferenças de redução dos nutrientes para cada tipo de nutriente estudado. Já que a interação entre as folhas e a radiação é desigual, corroborando essa variação de 33 a 96% de diferença entre a queda dos teores e diminuição do valor nutricional.

O cozimento em fogão convencional, conhecido como cocção úmida por imersão, também mostrou perdas significativas de nutrientes, de 50 a 90%, neste caso esse comportamento é explicado devido ao uso de uma grande quantidade de água que se utiliza para o preparo térmico, em virtude disso a perda ocorre tanto pelo processo de lixiviação quanto pela remoção de nutrientes do conteúdo intracelular por ação da água. O aquecimento neste caso ocorre pelo processo de convecção, na qual as moléculas transmitem calor às vizinhas por contato, sendo assim um aquecimento que ocorre de fora para dentro.

Ao passo que a menor perda dos nutrientes ocorreu quando se utilizou o cozimento a vapor. Esse comportamento pode ser explicado por dois motivos: o fato de o alimento não estar diretamente em contato com a água evita as perdas por lixiviação e difusão, bem como o calor específico do vapor d'água ser menor que o da água em estado líquido que está gerando esse calor.

## 10.2. COMPOSIÇÃO MINERAL DAS FOLHAS DE CHICÓRIA DE ACORDO COM O MÉTODO DE COCÇÃO

A composição da folha de chicória foi comparada também com as informações da tabela de referência TACO.

**Tabela 7** – Dados de concentração em mg 100 g<sup>-1</sup> da folha de chicória crua.

Elementos	Ba	TACO (2011)*
Ba	1,4 ± 0,4	-
Ca	32,2 ± 4,6	45
Fe	<LD	0,5
K	43 ± 11	435
Mg	1,2 ± 0,6	14
Na	18,8 ± 6,3	14
P	1,92 ± 0,01	13
S	0,9 ± 0,1	-

Zn	0,9 ± 0,3	0,1
----	-----------	-----

---

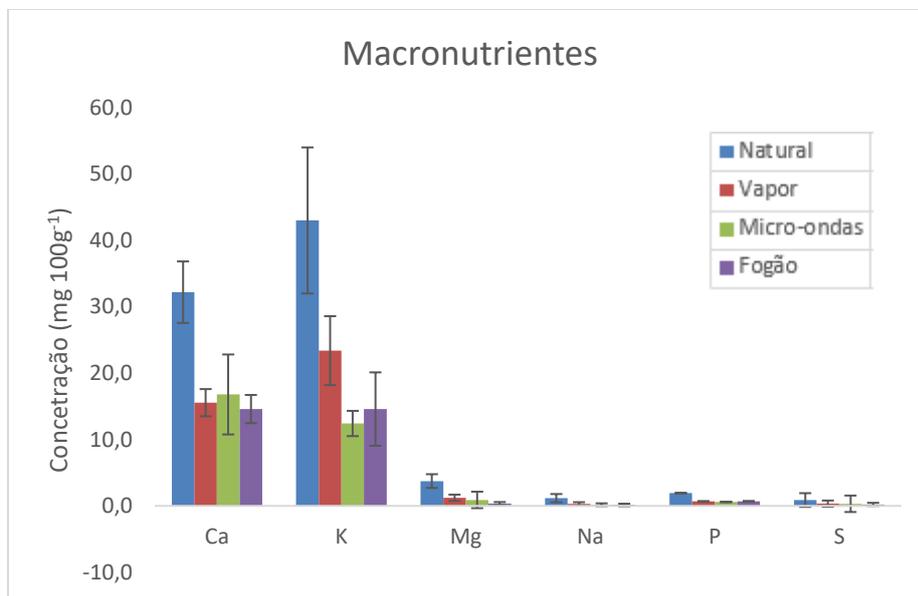
No geral, pode-se observar que os valores encontrados foram abaixo dos obtidos pela tabela de composição de alimentos, mas como foi explicado no tópico anterior esses valores podem variar de acordo com questões empíricas e de sazonalidade, não invalidando os resultados obtidos.

No caso do sódio, a planta pode se desenvolver sem sua presença, porém em locais que há baixa concentração de gás carbônico, o sódio auxilia no aumento da eficiência da fotossíntese e além disso em algumas espécies, o Na pode substituir o K, com benefícios para a planta (70).

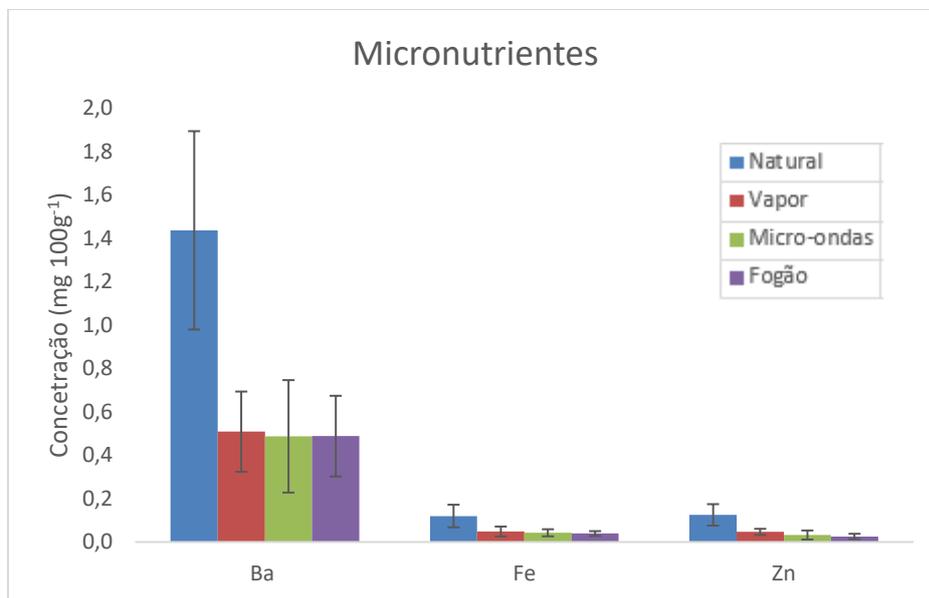
O teor de cálcio foi maior do que o encontrado na tabela de referência o que explica a redução do teor de potássio e magnésio presentes, pois ambos têm inibição competitiva, ou seja, estes elementos competem pelo mesmo sítio de absorção da planta.

As folhas de chicória foram coletadas somente em mercados localizados na cidade de Salvador, Bahia e passaram pelos processos de cozimento descritos no item 8.4. As figuras 14 e 15 trazem a concentração dos analitos nas amostras cruas, comparando-as com as amostras que passaram pelas operações térmicas de preparo, contrastadas com as amostras cozidas micro-ondas, fogão e vapor. Os resultados correspondem a média da concentração de cada elemento num grupo de 24 amostras cada.

**Figura 11** - Gráfico dos teores de macrominerais de acordo com o tipo de processamento em amostras de folhas de chicória



**Figura 12**- Gráfico dos teores de microminerais de acordo com o tipo de processamento em amostras de folhas de chicória



Observa-se que para os elementos contidos no gráfico da figura 15, praticamente não houve variação média entre as concentrações independente do tratamento térmico de cozimento. Esse comportamento pode ser explicado devido ao fato da energia empregada pelo cozimento não ter sido suficiente para lixiviar/extrair os nutrientes, sendo que estes se encontram presos em estruturas químicas estáveis, como no caso do enxofre que ao ser incorporado pela estrutura da planta se liga a compostos orgânicos pouco móveis, sendo os aminoácidos que os contem muito estáveis (74).

No caso dos macrominerais, o cozimento em vapor se mostrou uma forma de cozimento melhor, com queda nos teores de cálcio e potássio em torno de 50%, enquanto os outros elementos as quedas giraram em torno de 60-70% comparada a amostra natural.

Diferente da amostra de mostarda, a diferença entre as amostras que passaram pelo cozimento seja em forno ou micro-ondas não foram significativas, indicando perdas semelhantes independente do elemento estudado. Característica essa ainda mais evidente no caso dos microminerais.

Porém, analisando os valores individuais, a chicória apresentou o mesmo comportamento da folha de mostarda, indicando que o cozimento por micro-ondas leva a maior perda dos nutrientes.

## **11. ANÁLISE MULTIVARIADA DAS AMOSTRAS DE MOSTARDA E CHICÓRIA**

Para analisar se há a formação de um padrão nos grupos das amostras que passaram pelos diferentes tratamentos de cozimento, foram utilizados dois métodos quimiométricos de análise multivariada, métodos esses supervisionados: a Análise de Componentes Principais (PCA) e o Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA).

## 11.1. AMOSTRAS DE MOSTARDA

Uma matriz de dados com dimensão 48x09 pré-processada através da centralização dos dados na média, processo esse que utiliza a média de cada coluna e subtrai esses dados nas linhas correspondentes dessa mesma coluna na matriz de dados. Esse pré-tratamento foi escolhido, pois como a dimensão das amostras é próxima não se faz necessário a normalização dos dados

Após os dados serem ortogonalizados através da decomposição dos vetores singulares, obteve-se os valores dos pesos das variáveis e dos scores das amostras ao longo de PC1 e PC2. Porém os resultados do PCA não foram satisfatórios para a separação das amostras, como se observa na Tabela 8 uma vez que com exceção do Bário e do Magnésio, todas as demais variáveis possuem maior carga na PC1, já que a amostra de magnésio estava com o peso semelhante nas duas componentes.

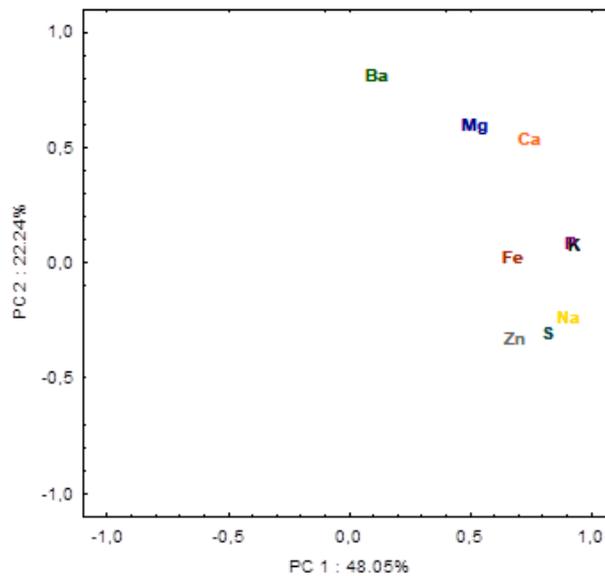
**Tabela 8** – Peso das variáveis em PC1 e PC2

Variáveis	Sem rotação		Varimax	
	PC1	PC2	PC1	PC2
<b>Bário</b>	-0.1055	0.7685	-0.2045	<b>0.7483</b>
<b>Cálcio</b>	-0.7360	0.4946	0.4829	<b>0.7438</b>
<b>Ferro</b>	-0.6653	-0.0163	0.6183	0.2461
<b>Potássio</b>	-0.9195	0.0306	<b>0.8337</b>	0.3890
<b>Magnésio</b>	-0.5116	0.5569	0.2520	<b>0.7130</b>
<b>Sódio</b>	-0.8985	-0.2774	<b>0.9353</b>	0.0974
<b>Fosfóro</b>	-0.9075	0.0387	<b>0.8195</b>	0.3917
<b>Enxofre</b>	-0.8087	-0.3521	<b>0.8820</b>	-0.0065
<b>Zinco</b>	-0.6743	-0.3686	0.7648	-0.0744
<b>Variância total</b>	53.80	16.50	48.05	22.25
<b>%</b>				
<b>Variância</b>	53.37	70.30	48.05	70.30
<b>cumulativa %</b>				

Os dados foram reavaliados por meio da análise fatorial por rotação Varimax, que é um tipo de rotação mais comumente utilizado, pois procura minimizar o número de variáveis que apresentam altas cargas em cada fator. A Tabela 8 também exhibe os

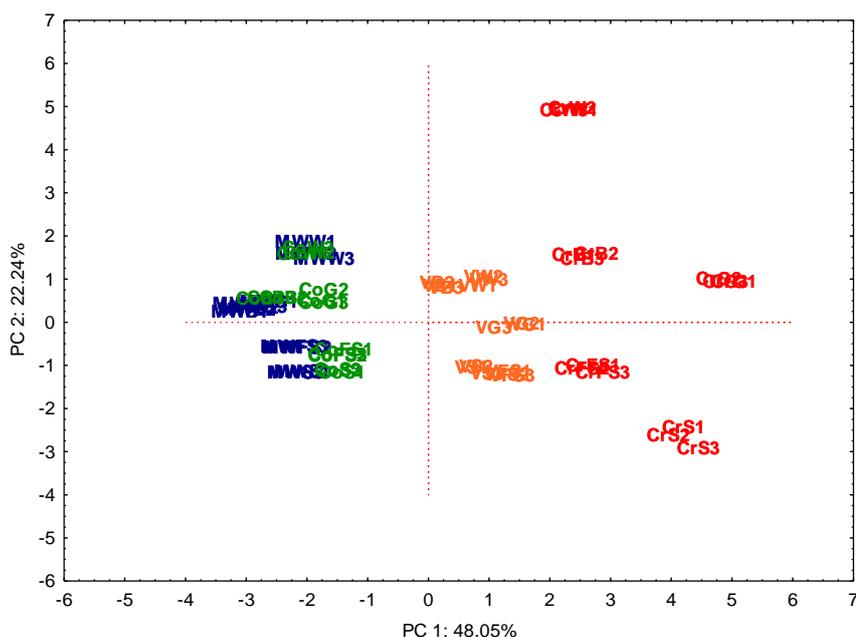
resultados do Varimax obtidos, mostrando que os carregamentos de todos os elementos estão distribuídos em PC1 ou PC2, acumulando uma variância de 70,30% nas duas componentes principais. Em negrito destacam-se os maiores pesos dentre as duas componentes principais para cada variável, o que indica maior explicação da variável pela PC's.

**Figura 13 – Gráfico de Pesos**



Adicionalmente, pode-se observar, pelo gráfico de pesos que a PC1 é dominada pelas concentrações de sódio, enxofre, potássio e fósforo, já a PC2 é dominada pelos elementos bário, cálcio e magnésio.

**Figura 14 – Gráfico de scores das amostras de mostarda**



Considerando os valores dos pesos para os elementos obtidos pela rotação Varimax na Tabela 2, podemos concluir que a Figura 1 mostra que o conteúdo mineral das folhas de mostarda depende do método de cozimento empregado. Também é possível observar que as concentrações minerais nas amostras de folhas em ordem decrescente são: amostras cruas, seguidas de amostras cozidas em vapor, amostras cozidas no fogão e as concentrações mais baixas para amostras cozidas em forno de micro-ondas.

Se analisar na perspectiva da PC1 essa separação entre dois grandes grupos (cru/vapor e micro-ondas/fogão) é influenciada pela queda dos teores de potássio, sódio, fósforo e enxofre, corroborando com os dados individuais, que indicou, para esses minerais as maiores perdas quando sofriam aquecimento seja por fogão ou micro-ondas.

A análise de componentes principais foi adequada pois foi possível reduzir a quantidade de variáveis que explicam satisfatoriamente os dados, isso só é possível

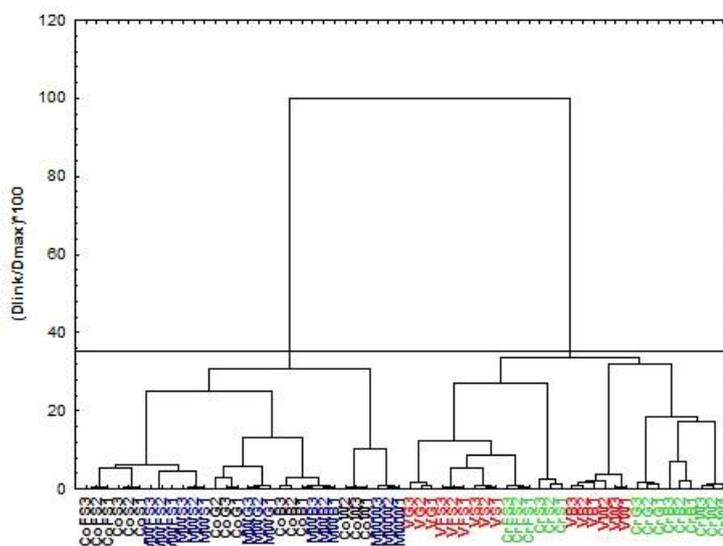
devido a existência de correlação entre as variáveis, como pode ser vista na matriz de correlação, corroborando com o que foi discutido acima.

**Tabela 9 - Matriz de correlação**

	Ba	Ca	Fe	K	Mg	Na	P	S	Zn
Ba	<b>1,00</b>	0,38	-0,04	0,14	0,13	0,11	0,23	-0,22	0,03
Ca	0,38	<b>1,00</b>	0,52	0,60	0,59	0,49	0,60	0,53	0,25
Fe	-0,04	0,52	<b>1,00</b>	0,55	0,38	0,40	0,39	0,42	0,61
K	0,14	0,60	0,55	<b>1,00</b>	0,49	<b>0,82</b>	<b>0,84</b>	<b>0,72</b>	0,56
Mg	0,13	0,59	0,38	0,49	<b>1,00</b>	0,34	0,42	0,17	-0,02
Na	-0,11	0,49	0,40	<b>0,82</b>	0,34	<b>1,00</b>	<b>0,87</b>	<b>0,84</b>	0,64
P	0,23	0,60	0,39	<b>0,84</b>	0,42	<b>0,87</b>	<b>1,00</b>	0,71	0,61
S	-0,22	0,53	0,42	0,72	0,17	<b>0,84</b>	0,71	<b>1,00</b>	0,47
Zn	0,03	0,25	0,61	0,56	-0,02	0,64	0,61	0,47	<b>1,00</b>

A HCA foi aplicada aos mesmos dados que foram processados pela rotação Varimax usando o método *single linkage*, e o dendrograma obtido é mostrado na Figura 15.

**Figura 15 - Dendrograma para amostras de mostarda de acordo com os métodos de cocção**



Através da linha de corte podem ser vistos dois grupos: o primeiro envolvendo as amostras brutas e as cozidas em um banho-maria e outro contendo as amostras cozidas no fogão e no micro-ondas, os dados estão em consonância com os obtidos através do PCA.

Com isso, o principal objetivo de ambas as análises foi cumprido: Redução do número de variáveis sem perda significativa de informação sobre a variabilidade do conjunto de variáveis originais permitindo a interpretação dos dados de forma simplificada.

Além dos métodos não supervisionados de análise, foi realizado o LDA, método este supervisionado a fim de classificar as amostras. A análise de discriminante linear delimita a fronteira entre duas classes e é extraída através de linearização da PCA, com o intuito de reduzir a variabilidade dentro das classes e maximizá-las entre classes. Porém pode ocorrer perdas de informação quando feito esse processo, desta forma é importante selecionar as variáveis que mais influenciam na variabilidade dos grupos e entre os grupos, já que esse método supervisionado procura uma fronteira linear entre as classes.

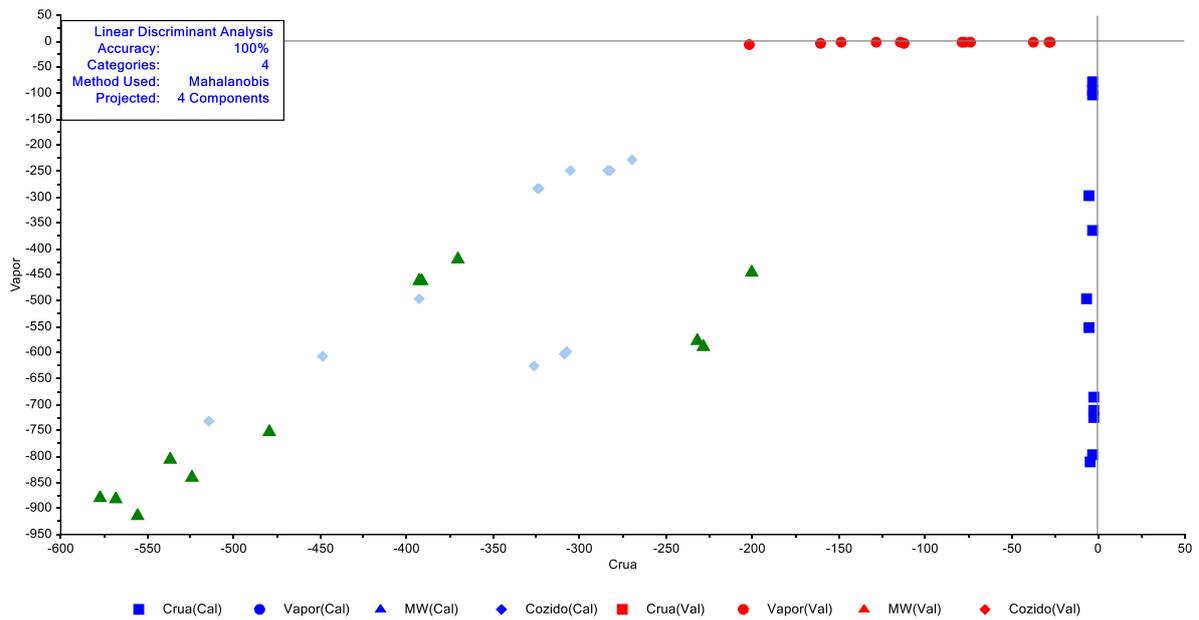
Através de LDA, esses problemas podem ser evitados, pois trata-se de um método que utiliza informações das categorias associadas a cada padrão para extrair linearmente as características mais discriminantes. Em LDA, a separação interclasses é enfatizada através da substituição da matriz de covariância total do PCA por uma medida de separabilidade.

Os dados de cada conjunto de dados foram divididos aleatoriamente em 2 subconjuntos: um conjunto de calibração (Cru-Cal, Vapor-Cal, MW-Cal e Cozido-Cal), utilizados para calibrar o modelo e um conjunto de validação (Cru-Val, Vapor-Val, MW-Val e Cozido-Val), que foi usado para validação. Para a validação do modelo foi utilizado o tipo de validação cruzada, do inglês, Cross Validation, na qual retira-se

amostras do conjunto de treinamento, construindo um novo modelo, com o objetivo de construir um conjunto teste.

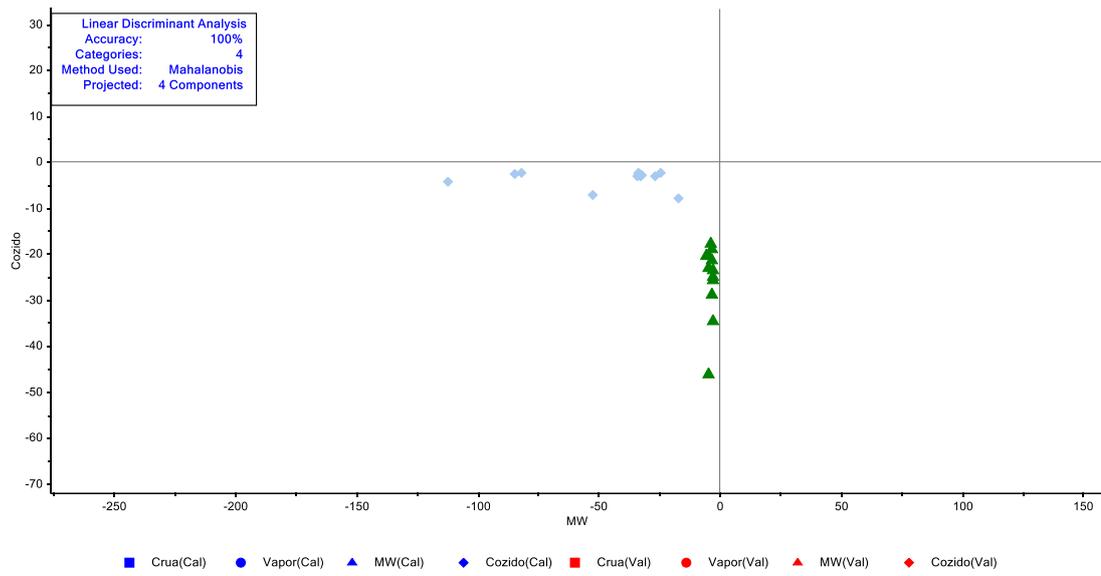
A análise do Gráfico de LDA ocorre comparando dois a dois grupos, e é um método fácil e robusto de se utilizar, e sempre procura classificar as amostras em algum dos grupos formados.

**Figura 16 - Biplot dos discriminantes (Crua x Vapor)**



O gráfico de discriminantes (Crua x Vapor) indica as separações das duas amostras, pois elas estão distribuídas nas linhas, delimitando as amostras linearmente.

**Figura 17-** Biplot dos discriminantes (Cozida x Micro-ondas)



Plotando os gráficos das amostras cozidas (azul) e micro-ondas (verde), mostra que houve também uma separação entre ambas as classes. Já que elas estão distribuídas separadas, mas linearmente das retas.

Neste tipo de análise é comum representar os resultados por meio da tabela de contingência e, a partir dela é possível calcular a exatidão, sensibilidade, taxa de falsos positivos e seletividade.

A tabela de contingência obtida com as 12 amostras usadas para a predição, confirmou que as amostras foram classificadas corretamente em cada classe.

**Tabela 10** – Tabela de contingência.

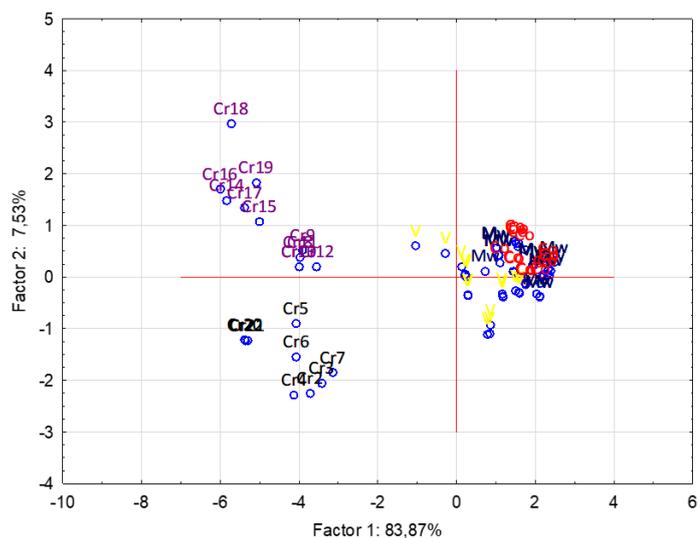
	<b>Crua</b>	<b>Vapor</b>	<b>MW</b>	<b>Cozido</b>
<b>Crua</b>	12	0	0	0
<b>Vapor</b>	0	12	0	0
<b>MW</b>	0	0	12	0
<b>Cozido</b>	0	0	0	12

E com isso os valores de exatidão, sensibilidade, e seletividade chegaram a 100%. Porém, vale ressaltar que no caso dos dados em questão o número de amostras é pequeno para considerar uma análise mais satisfatória dos dados.

## 11.2. AMOSTRAS DE CHICÓRIA

No caso, do grupo das amostras de chicória, um total de 96 amostras, 24 amostras para cada procedimento de cocção descrito previamente, foram analisados pelo ICP OES. Depois disso, o resultado gerou uma matriz (96x09), o pré-processamento também foi centralizar os dados na média, pelo mesmo motivo dos dados anteriores.

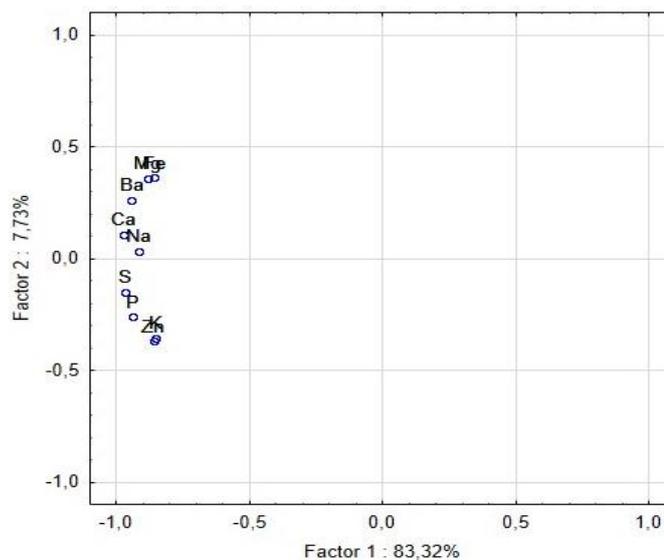
**Figura 18** - Gráfico de scores para as amostras de chicória



O gráfico de scores na Figura 20 mostra uma tendência de separação em dois grandes grupos, amostras cruas e amostras em vapor/cozidas/micro-ondas, analisando no sentido da PC1, que acumula 83,32% da variância, explicado pela queda de todos os minerais independentemente do tipo de cozimento empregado, somente algumas amostras tratadas a vapor estão mais afastadas do grande grupo formado.

No sentido da PC2 existe uma separação das amostras cruas em dois grupos, apresentados em roxo e preto, essas amostras provêm de localidades diferentes e apresentaram maiores teores Ca, Na, Ba e principalmente de Magnésio e Ferro, com relação a outras amostras, dados esses que corrobora com o gráfico de pesos na figura 21.

**Figura 19 - Gráfico de pesos**



O gráfico de pesos evidencia que os grupos formados apresentam essa tendência de separação, pois as amostras cruas, possuem altos valores de todos os nutrientes estudados, o que já era de se esperar pelo fato de as amostras estarem in natura. Já analisando o grupo de amostras cruas, evidenciam-se que os teores dos minerais citados na anteriormente favorecem a separação.

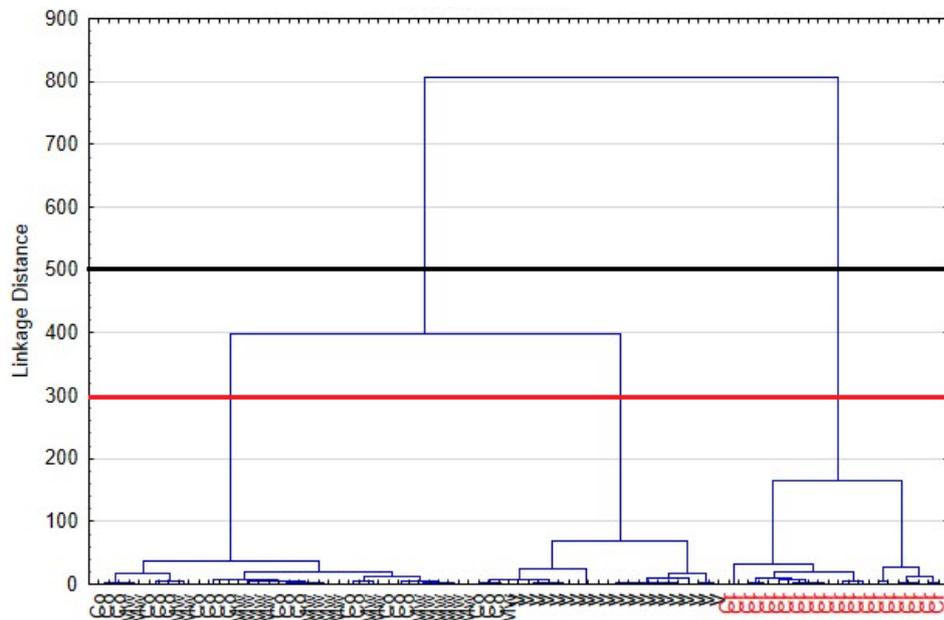
A análise de componentes principais foi adequada pois foi possível reduzir a quantidade de variáveis que explicam satisfatoriamente os dados, isso só é possível devido a existência de correlação entre as variáveis, como pode ser vista na matriz de correlação, corroborando com o que foi discutido acima.

**Tabela 10 – Matriz de correlação**

	Ba	Ca	Fe	K	Mg	Na	P	S	Zn
Ba	<b>1,000</b>	<b>0,956</b>	<b>0,880</b>	0,713	0,921	0,869	0,822	0,871	0,713
Ca	0,956	<b>1,000</b>	0,844	0,771	0,911	0,882	0,900	0,928	0,804
Fe	0,880	0,844	<b>1,000</b>	0,623	0,826	0,778	0,706	0,767	0,634
K	0,713	0,771	0,623	<b>1,000</b>	0,602	0,837	0,836	0,852	0,773
Mg	<b>0,921</b>	<b>0,911</b>	<b>0,826</b>	0,602	<b>1,000</b>	0,776	0,754	0,798	0,658
Na	0,869	0,882	0,778	0,837	0,776	<b>1,000</b>	0,814	0,897	0,673
P	0,822	0,900	0,706	0,836	0,754	0,814	<b>1,000</b>	<b>0,960</b>	<b>0,936</b>
S	0,871	0,928	0,767	0,852	0,798	0,897	0,960	<b>1,000</b>	0,873
Zn	0,713	0,804	0,634	0,773	0,658	0,673	0,936	0,873	<b>1,000</b>

Diferente das amostras de mostarda para as amostras de chicória o HCA foi realizado utilizando o método de Ward como encadeamento das amostras, pois, foi possível observar pelo PCA que as amostras apresentam muita similaridade entre si, o que geraria muitas ligações entre elas dificultando a interpretação ou até mesmo levando a análises equivocadas.

**Figura 20** - Dendrograma para as amostras de chicória de acordo com os métodos de cocção



A linha de corte em preto indica a separação dos dois grupos, as amostras cruas e as outras amostras que passaram pelos métodos de cocção, esses dados ratificam os obtidos através do PCA. Já, a linha de corte em vermelho mostra a separação em três grupos: amostras de micro-ondas e cozidas, amostras em vapor e as amostras cruas, indicando que há uma tendência de formação desses três grupos, mostrando que as quedas dos teores dos minerais são maiores nas amostras cozidas em fogão e micro-ondas, já que apresenta alta similaridade entre elas, enquanto as amostras de vapor formam um outro grupo. Esses dados estão em concordância com os obtidos pelo PCA e com os dados individuais obtidos.

## **12. INGESTÃO DIÁRIA RECOMENDADA (IDR) E O CONSUMO DE POTÁSSIO EM PACIENTES COM PROBLEMAS RENAIIS.**

A dieta que cada indivíduo consome está ligada a diversos fatores, como: idade, fatores de risco, gênero outras particularidades, porém a Ingestão Diária Recomendada (IDR), aponta a quantidade de vitaminas, minerais e proteínas que

devem ser consumidos por dia com o objetivo de atender às necessidades nutricionais da maior parte dos indivíduos e grupos de pessoas de uma população sadia.

Conhecida também como a *Dietary Reference Intakes* (DRI), constitui a mais recente revisão dos valores de recomendação dos nutrientes, adotada pela OMS e muito utilizada pelo o *Institute of Medicine* norte-americano e a agência *Health Canada* e essas publicações substituem as sucessivas versões das *Recommended Dietary Allowances* (RDA), cuja décima revisão foi editada em 1989 (76).

No Brasil a Agência Nacional Vigilância Sanitária (ANVISA), através da Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005 (77), usa como referência os valores apresentados pelas organizações descritas acima, e apresenta uma tabela de IDR que contém dados dos diferentes minerais, proteínas e vitaminas, para diferentes faixas etárias, sexo, gestante e lactantes.

Neste trabalho a referência será a tabela IDR para adultos, o cálculo foi baseado na recomendação da OMS e da FAO que orienta o consumo de 5 porções de frutas e vegetais por dia, em torno de 400 g, o que ajudaria a prevenir de doenças crônicas como cardiopatias, câncer, diabetes tipo 2 e obesidade. Segundo as duas organizações, o consumo de uma ampla variedade de frutas e verduras assegura uma dose adequada da maioria dos micronutrientes, fibras e outras substâncias essenciais. O aumento do consumo de frutas e verduras também pode substituir o consumo excessivo de alimentos que contêm muita gordura saturada, açúcar e sal (78).

**Tabela 11** – Porcentagem de IDR para o consumo de 100g de mostarda e chicória

Minerais	IDR (mg/d) <sup>a</sup>	%IDR (consumo de mostarda)	%IDR (consumo de chicória)
Ca	1000	5,3	3,2
Fe	14	6,1	0,9
K	4700	2,6	0,9
Mg	260	12,7	0,4
Na	1500	1,3	0,2
P	700	4,8	0,3
Zn	7	17,8	1,8

<sup>a</sup>miligramas/dia

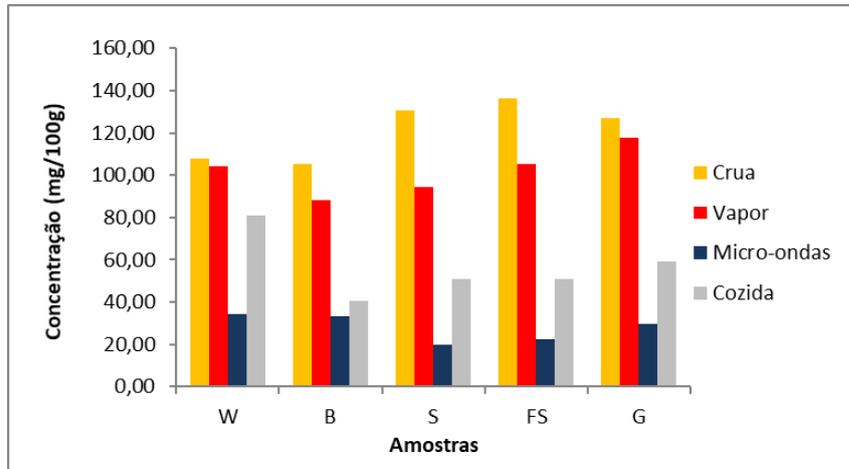
Como é perceptível, a mostarda possui uma maior contribuição para a atingir os valores recomendados, porém é necessário ressaltar que a absorção dos minerais depende de fatores dietéticos de absorção - a biodisponibilidade.

Segundo a resolução RDC Nº 54, DE 12 DE NOVEMBRO DE 2012, a mostarda e a chicória não podem ser consideradas alimentos de alto valor nutricional, pois não possuem minerais que atinjam o mínimo de 30% do IDR, desta forma são consideradas somente fontes de minerais, levando em consideração o consumo de 100g dessas hortaliças.

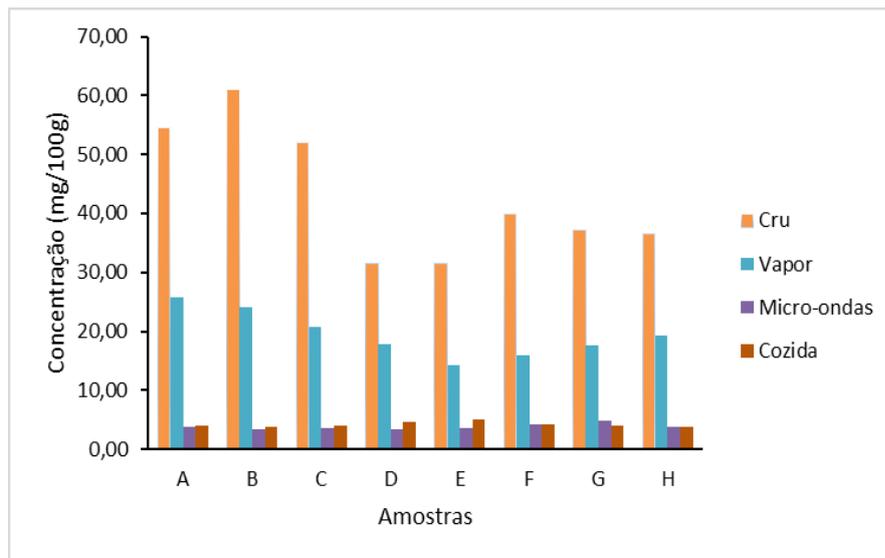
É importante estar atento aos valores nutricionais, pois muitas especificidades levam pessoas a precisar reduzir o consumo de determinados tipos de alimentos que apresentem altos teores de um determinado mineral, como no caso de pacientes renais crônicos que necessitam consumir alimentos com baixo teor de potássio para prevenir hipercalemia (79). Dessa forma, vários trabalhos foram realizados para determinar o método de cozimento mais aplicado à redução do teor de potássio em alimentos vegetais. Um estudo demonstrou que o micro-ondas e o cozimento sob pressão são mais eficientes na redução do teor de potássio nos brócolis (80). Outro estudo observou que o cozimento da fruta-pão com fogão é mais eficiente para a redução de potássio do que com forno de micro-ondas (81).

Nesse contexto, os resultados do potássio e chicória foram estudados separadamente e estão apresentados na Figura 21 e 22.

**Figura 21 – Teores de potássio nas amostras de mostarda**



**Figura 22 - Teores de potássio em amostras de chicória**



Nesse sentido, pode-se observar que o método de cozimento em forno de micro-ondas é o mais eficaz para a redução do teor de potássio nas folhas de mostarda, independente da origem e do tipo de amostras estudadas, essas perdas de minerais

durante o cozimento não são causadas pela destruição desses nutrientes e sim pela dissolução para a água de cocção. Esse é um fator relevante, do ponto de vista nutricional, tanto no que diz respeito a preservação desses nutrientes para manutenção da saúde, quanto para a redução das suas concentrações para o controle das complicações de algumas patologias, como é o caso do potássio para a doença renal (82).

### **13. CONCLUSÕES PARCIAIS**

Através dos experimentos e análises realizados é possível inferir que os minerais dependem fundamentalmente do processo de cozimento na qual as hortaliças são submetidas, evidenciando que cozinhar em forno micro-ondas provoca a maior perda de minerais, independente da hortaliça. Através das técnicas de análise multivariada PCA e HCA, foi possível reconhecer padrões dentre os grupos de amostras que sofreram o mesmo procedimento térmico, confirmando que a composição mineral das folhas de mostarda depende do processo de cozimento utilizado. E o uso do LDA, comprovou a existência de classes distintas correspondentes a cada método de cozimento. Portanto, é importante esse tipo de estudo pois elucida o comportamento dos minerais e a melhor forma de prepará-los, a depender do objetivo, como no caso de pacientes renais cozinhar em micro-ondas fez-se melhor alternativa, pois reduz drasticamente o teor de potássio, evitando problemas como hipercalemia.

## **CAPÍTULO II – DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS EM HORTALIÇAS POR CG-MS**

## 1. PESTICIDAS

Pesticidas, biocidas, defensivos agrícolas, praguicidas e agrotóxicos são comumente usados com o mesmo significado, embora definições mais restritas possam incluir ou excluir dessas classificações diferentes grupos de substâncias químicas. Os pesticidas são substâncias que podem matar diretamente um organismo indesejável ou controlar o processo reprodutivo. Todos os pesticidas químicos têm a propriedade comum de bloquear um processo metabólico vital para os organismos para os quais são tóxicos. (83).

Através da descoberta de que o diclorodifeniltricloroetano (DDT) era capaz de evitar a contaminação por tifo, os organoclorados passaram a apresentar um grande potencial como pesticidas, por consequência, a dispersão desses compostos ocorreu sem nenhum controle em diversos locais do mundo.

Com isso, até um determinado momento da história, o uso de pesticidas mudou o cenário de produção de alimentos, pois uso dessas substâncias caracterizou um marco na agricultura, se tornando comum na agroindústria, pois evita que pragas interfiram na colheita de vegetais, frutas e outros tipos de alimentos, aumentando assim a produtividade. Porém, o entusiasmo inicial do efeito pesticida dos organoclorados foi ao longo dos anos perdido, mediante observação de que insetos desenvolviam resistência a estes compostos. Sua resistência a biodegradação promoviam o acúmulo no meio ambiente e experimentos com animais mostraram sua carcinogenicidade (84).

Atualmente, de acordo com a literatura ainda existem mais de 600 tipos de pesticidas que são utilizados mundialmente na agricultura, sendo os herbicidas, os mais empregados em larga escala (85).

Como os pesticidas são intencionalmente aplicados às culturas para atingir um determinado objetivo, frutas e vegetais se tornam as principais fontes de ingestão alimentar de resíduos (86) e potenciais poluidores do meio ambiente. Porém, seu uso

continua sendo justificado já que no mundo, as perdas anuais devido à ação de pragas na agricultura chegam a 1 bilhão de toneladas, correspondendo a uma redução de 20 a 30% na produção (87).

O Brasil é um dos maiores consumidores mundiais de agrotóxicos e estas substâncias têm conhecidas implicações no contexto da saúde pública afetando diretamente os trabalhadores agrícolas e também a população em geral por meio do consumo da água e dos alimentos contaminados (85), já que em sua maioria os pesticidas são absorvidos pelas vias cutâneas, orais e respiratórias.

Diversos processos afetam a persistência dos inseticidas após sua aplicação nas plantas como, por exemplo, foto decomposição, degradação química e biológica, volatilização, absorção pela cutícula da folha e lavagem pela água da chuva. Diferenças na forma e permeabilidade da cutícula das folhas influenciam a quantidade do inseticida absorvido. Outro fator importante é a polaridade da molécula (88). Moléculas lipofílicas podem penetrar mais facilmente na cutícula das folhas e, assim, se tornarem mais persistentes por estarem mais protegidas dos processos de dissipação (89)

Por isso é importante o constante monitoramento dessas substâncias e encontrar alternativas ao seu uso na produção de alimentos.

## **1.1. CLASSIFICAÇÃO DOS PESTICIDAS**

Esta variedade de agentes podem ser classificados com base no padrão de uso (desfolhantes, repelentes, dissecentes etc.), no organismo-alvo (inseticidas, fungicidas, herbicidas, rodenticidas e/ou raticidas, acaricidas, nematocidas, fumigantes, moluscicidas etc.), na estrutura química (piretróides, atrazinas, organofosforados, organoclorados, estribulinas, carbamatos), no mecanismo tóxico de ação (anticolinesterásicos, anticoagulantes etc) e na toxicidade (classe toxicológica

que utiliza a Dose Letal 50 oral ou dérmica de ratos como parâmetro), esta última é recomendada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), que classifica as substâncias segundo seu grau de periculosidade (90).

### **1.1.1. ORGANOCLORADOS**

A classificação dos pesticidas através de sua classe química é de extrema importância pois seu mecanismo de ação, degradação e propriedades, dependem diretamente deste critério.

O primeiro pesticida usado na agricultura pertence à classe dos organoclorados, o DDT, que apesar de ter sido sintetizado em 1874, só foi utilizado como pesticida em 1940. Devido a sua baixa solubilidade em água e alta persistência, propiciou resultados significativos e começou a ser utilizado para controle de pragas na agricultura, principalmente colheitas de alto rendimento (91). Porém são altamente resistentes aos mecanismos de decomposição dos sistemas biológicos, o que faz com que permaneçam no meio ambiente, sendo os agrotóxicos mais persistentes já fabricados, pois era uma substância quimicamente estável.

As vias de absorção dos organoclorados são variadas e eficazes, o que faz com que se torne difícil estabelecer relações entre causa e efeito, uma vez que sinais e sintomas clínicos podem aparecer um longo período após a exposição (92). Além disso, por possuir uma baixa pressão de vapor, compostos organoclorados volatizam praticamente 90% em um período de três dias, constituindo uma fonte em potencial de transporte dessas substâncias em larga escala e constituindo a via respiratória como uma das vias de absorção, porém a maior contaminação acontece pela via digestiva por ser uma substância com características lipofílicas.

Já no organismo, os organoclorados atuam basicamente no sistema nervoso central e no sistema de defesa do organismo e causam sérias lesões hepáticas e renais. Alguns produtos desse grupo lesam o cérebro, outros os músculos do coração, a medula óssea, o córtex da supra-renal, o DNA etc. A atividade estrogênica,

estimulando a testosterona e propiciando a puberdade precoce, foi comprovada para o DDT, além de casos de câncer em pessoas de diferentes gêneros e faixas etárias

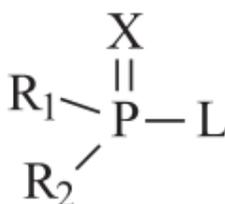
Por estes motivos, a PORTARIA Nº 329, DE 02 DE SETEMBRO DE 1985, proibiu o uso de organoclorados, tais como: ALDRIM, BHC, CANFENO CLORADO (TOXAFENO), DDT, DODECLACORO, ENDRIM, MEPTACORO, LINDANE, ENDOSULFAN, METOXICORO, NONACORO, PERTACOROFENOL, DICOFOL e CLOROBENZILATO, somente permitindo seu uso em campanhas de saúde pública de combate a vetores de agentes etiológicos de moléstias; e o uso emergencial na agricultura, a critério da Secretaria Nacional Defesa Agropecuária - SNAD - do Ministério da Agricultura (93).

### 1.1.2. ORGANOFOSFORADOS

Os pesticidas organofosforados estão entre os pesticidas mais amplamente utilizados no mundo (94). Hoje, historicamente, postula-se que os pesticidas organofosforados surgiram na década de 40, mas os principais representantes desta classe foram introduzidos na década de 60 e 80 e mesmo com a implantação de outras classes de pesticidas e de novas metodologias de controle de pragas, 40% do mercado mundial de pesticidas em 1999 era representado por organofosforados (95).

O uso dos organofosforados veio com o objetivo de substituir os organoclorados, devido a produção mais simples, resultando em custo de produção reduzido e baixa toxidez. E possui estrutura geral descrita na figura 25.

**Figura 23** - Estrutura geral dos organofosforados



Sendo, X = O, S e Se; R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> = alquil, SR', OR' e NHR'; L= alquil, aril, heterocíclicos.

A principal razão para o sucesso dos compostos organofosforados como inseticidas é sua forte atividade biológica acoplada com sua relativa instabilidade na biosfera, que se traduz em uma meia-vida em plantas da ordem de 2 até 10 dias.

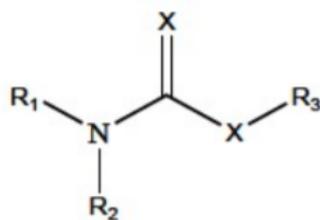
No Brasil, a ocorrência de intoxicações por pesticidas do grupo dos organofosforados continua sendo alta, apesar de seu uso ter diminuído em relação à década dos anos oitenta (96).

As intoxicações por carbamatos e organofosforados resultam do uso do inseticida na agricultura, em exposição acidental, suicídio e, raramente, homicídio. As intoxicações mais graves relacionam-se a tentativa de autoextermínio, enquanto as moderadas relacionam-se a intoxicação acidental. Essas intoxicações constituem importante problema de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento, devido aos maiores índices de morbimortalidade relativos a essas substâncias (97).

### **1.1.3. CARBAMATOS**

Os carbamatos são uma classe de pesticidas mais recentes que os organoclorados e apareceu em substituição aos organofosforados, porem são uma classe de inseticidas estrutural e mecanicamente semelhantes aos inseticidas organofosforados, sendo N-metil derivados de um ácido carbâmico (Figura 24).

**Figura 24** - Estrutura química geral dos carbamatos



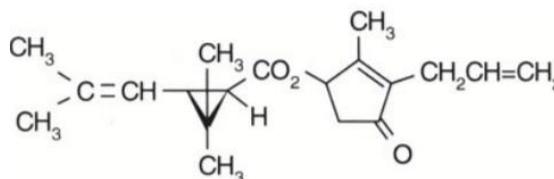
Os carbamatos derivam do ácido carbâmico e, na sua estrutura geral, o X pode ser oxigênio ou enxofre, o R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> são, geralmente, substitutos orgânicos ou alquil, podendo também ser hidrogênio e R<sub>3</sub> é, na maioria dos casos, um substituto orgânico ou, por vezes, um metal (98).

A exposição à inseticida carbamato no sistema respiratório leva diminuição da acetilcolinesterase e conseqüentemente os quadros clínicos incluem aumento acentuado das secreções brônquicas, dispnéias sibilais que parecem ser devidos a efeitos muscarínicos. A forma mais comum de morte é falência do pulmão que ocorre como resultado da broncoconstrição, broncorreia, paralisia dos tratos respiratórios e de pressão dos centros respiratório (99).

#### 1.1.4. PIRETROÍDES

O primeiro pesticida piretróide, aletrina (Figura 25), foi identificado em 1949, os piretróides são inseticidas de origem vegetal, obtidos a partir da trituração das flores de algumas plantas pertencentes ao gênero *Chrysanthemum cinerariaefolium* e *Chrysanthemum cocineum* (100).

**Figura 25** – Estrutura química da Aletrina



Os piretróides são, atualmente, os inseticidas mais utilizados na agricultura, estes compostos apresentam amplo espectro de atividade, ação rápida, eficiência em baixa dose, baixo poder residual no ambiente e, adicionalmente, é praticamente atóxico para mamíferos, quando comparados a outros inseticidas (101). Porém, outros ensaios indicam que são muito tóxicos para peixes, abelhas e artrópodes aquáticos, no entanto, não sofrem biomagnificação através da cadeia alimentar, porém há tendência para bioacumulação no organismo (102).

#### **1.1.5. AZÓIS**

Os componentes azólicos, classificados como tiazóis ou imidazóis, são usados como fungicidas na agricultura, biocidas em vários produtos e agente antifúngico em humanos e remédios veterinários. Alguns azóis são prescritos para terapia de câncer. As atividades biológicas desses componentes se baseiam na inibição de certas vias de esteroidogênese (103).

Os fungicidas azólicos usados na agricultura são moderadamente lipofílicos e bastante persistentes, com meias-vidas típicas de semanas a meses. Eles podem atingir o ambiente aquático principalmente por escoamento superficial e deriva de pulverização (104), um agravante do uso de fungicidas desse tipo devido ao uso constante e indiscriminado leva a multiplicação dos fungos resistentes a esses compostos.

Em ambientes aquáticos, somente tratamento bioquímico tradicional não pode remover completamente os fungicidas azólicos, eles podem entrar em efluente de águas residuais tratadas ou retornar ao ambiente terrestre por irrigação de águas residuais e uso de lodo no solo.

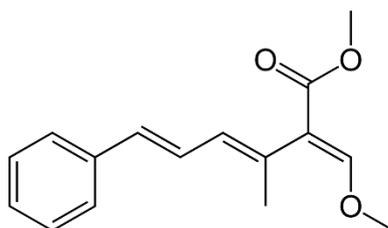
Porém esse tipo de pesticida é muito utilizado mundialmente, de acordo com a FAO (2008), o consumo de fungicidas atingiu uma área potencial de aproximadamente 800 mil hectares. Os números apontam o uso amplo de ingredientes ativos como fungicidas em áreas de plantação de hortaliças no Brasil, podendo ser 8 a 16 vezes

maior nessa produção do que o utilizado na cultura da soja. Isso indica que, cerca de 20% da comercialização de fungicidas no Brasil destinam-se ao uso em plantações de hortaliças consumidas pela população (105)

### 1.1.6. ESTROBIRULINAS

Em 1983, na Universidade de Kaiserlautern, o professor Timm Anke observou que um fungo (*Strobilus tenacellus*) que habitava cones de *Pinus* produzia uma substância que inibia o crescimento de outros fungos (106). Nos testes em casa de vegetação, verificou-se baixa atividade fúngica e alguns sintomas de fitotoxicidade nas culturas testadas. O motivo era a instabilidade da molécula, já que as ligações duplas eram facilmente rompidas pela ação da luz e do oxigênio.

**Figura 26** - Estrutura química da Estrobirulina - A



Com a alteração de algumas ligações químicas, obtiveram-se moléculas análogas (Figura 26), que possuíam a combinação de atividade antifúngica e com maior estabilidade do composto, essa substância foi isolada, sua estrutura foi identificada e denominada de estrobilurina – A. A utilização de fungicidas do grupo das estrobilurinas está entre as mais recentes adaptações dos produtores ao manejo cultural, com resultados positivos no controle de doenças (107).

Porém, por ser um tipo novo de fungicida é necessária atenção, pois ainda há dados limitados sobre seus efeitos, principalmente com relação a sua toxicidade em ambientes aquáticos (108). Um estudo publicado em 2015, por Li e colaboradores (109), relacionou as concentrações dos fungicidas encontrados no ambiente aquático com os riscos ecológicos e teratogênese em embriões de anfíbios, foi evidenciado que

os fungicidas estrobilurina eram altamente tóxicos para os embriões de anfíbios em concentrações ambientalmente relevantes.

### 1.1.7. QUANTO A TOXICIDADE

Os agrotóxicos são também classificados de acordo com a DL<sub>50</sub> e devem legalmente apresentar no rótulo uma faixa colorida indicativa de sua classe toxicológica, como indicada no quadro abaixo.

**Quadro 4 – Classificação de acordo com a DL<sub>50</sub>**

Classe	Grupo	DL <sub>50</sub> (mg/Kg)	Rótulo
I	Extremamente tóxicos	≤ 5	Faixa vermelha
II	Altamente tóxicos	5 - 50	Faixa amarela
III	Mediamente tóxicos	50 - 500	Faixa azul
IV	Pouco tóxicos	50 - 5000	Faixa verde

Fonte: BRASIL. Legislação federal de agrotóxicos e afins. Brasília: Ministério da Agricultura, Departamento de Defesa e Inspeção Vegetal, 1998. 184p.

De acordo com essa classificação os pesticidas podem ser descritos como extremamente tóxicos (classe Ia), altamente tóxicos (classe Ib), moderadamente tóxicos (classe II) e discretamente tóxicos (classe III).

Entretanto, através da RDC nº 24 de 29 de julho de 2019, o Brasil adotou o padrão internacional seguido por outros 50 países e deixou de lado os resultados baseados em irritação dos olhos e da pele e passou a usar somente o risco de morte como único critério para classificar tais produtos, resultando numa nova classificação, diferente da utilizada e que foi introduzida de acordo com a Portaria SNVS- MS nº 3/92.

A nova classificação é baseada no Sistema de Classificação Globalmente Unificado (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals – GHS) e alicerça em não considerar os resultados dos estudos toxicológicos de irritação ou sensibilização dérmica, ocular e inalatória como fins de classificação, mas somente para estabelecer a comunicação do perigo dos produtos.

Ao invés de quatro, seis categorias são estabelecidas para a classificação, identificada com os respectivos nomes das categorias e cores nas faixas do rótulo dos produtos, de acordo com o quadro abaixo:

**Quadro 5** - Nova classificação com base no método GHS

Categoria	Grupo	Rótulo
I	Produto extremamente tóxico	Faixa vermelha
II	Produto altamente tóxico	Faixa vermelha
III	Produto moderadamente tóxico	Faixa amarela
IV	Produto pouco tóxico	Faixa azul
V	Produto Improvável de Causar Dano Agudo	Faixa azul
VI – Não classificado	Produto Não Classificado	Faixa verde

Fonte: Ministério da Agricultura (2019)

## 1.2. LEGISLAÇÃO – USO DOS PESTICIDAS NO BRASIL

A utilização em massa de agrotóxicos na agricultura se inicia na década de 1950, nos Estados Unidos, com a chamada ‘Revolução Verde’, que teria o intuito de modernizar a agricultura e aumentar sua produtividade. No Brasil, esse movimento chega na década de 1960 devido a pressão internacional, já que o Brasil possui sua estrutura econômica basicamente sustentada pela agricultura, desta forma, implementou-se na década de 1970 o Programa Nacional de Defensivos Agrícolas (PNDA) (110).

Enquanto o DDT, já tinha sido banido praticamente em vários países a partir da década de 70, pois já se tinham estudos indicando sua alta toxicidade, porém no Brasil, somente em 1992, esse e outros pesticidas clorados foram banidos, tais como

o Aldrin e Heptacloro. Com isso, os fosforados passaram a substituir os pesticidas clorados.

O primeiro marco legislativo, foi a implementação da Lei nº7.802 de 1989, que regulamentava o uso de pesticidas e proibia o registro de substâncias que causassem câncer, teratogênese, mutagênese, distúrbios hormonais, que não haja antídoto ou tratamento eficaz e que apresentem perigosos para o homem. Traz também um artigo indicando que somente produtos que disponham de um método de desativação no Brasil possam ser comercializados (111).

Desta forma, a avaliação toxicológica é de extrema importância, para sanar essa questão e centralizar esse processo, promulgou-se a Lei nº. 9.782, de 26 de janeiro de 1999, criando a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, vinculada ao Ministério da Saúde e com atuação por todo o território nacional (112).

O Brasil supera em sete vezes a média mundial (0,5 kg/habitante) de pesticidas e atualmente é o maior consumidor deste tipo de produto, justificando o constante monitoramento destas substâncias em produtos agrícolas.

## **2. MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS**

O monitoramento de pesticidas em diferentes matrizes ambientais e em alimentos, devido a sua natureza tóxica e seu uso indiscriminado, traz uma demanda por metodologias capazes de determinar esses tipos de substâncias. As técnicas utilizadas são diversas e geralmente envolvem o uso de métodos cromatográficos como a Cromatografia Líquida – LC-MS/HPLC-MS (113); HPLC-UV(114); HPLC-DAD(115); HPLC-MS (116) e Cromatografia Gasosa – CG-FDP (Cromatografia Gasosa com Detector Fotométrico de Chama) (117); CG-FID (Cromatografia Gasosa com Detector por Ionização de Chama) (118) e CG-MS (Cromatografia Gasosa com

Espectrômetro de Massa) (119–121), sendo essa última a que apresenta maior quantidade de publicações, considerando a plataforma *Web of Science*.

Porém, para além das técnicas utilizadas, se faz necessário o uso de metodologias com o intuito de pré-concentrar os analitos, justificado devido as baixas concentrações encontradas relacionados aos processos de degradação, ocorrido principalmente no caso de matrizes ambientais: água, solo, dentre outros, e por processos de lixiviação e evaporação, principalmente em matrizes de alimentos. Juntamente com outras estratégias adotadas são aliados no momento em que se quer determinar esses analitos.

## **2.1. CROMATOGRAFIA GASOSA**

A cromatografia baseia-se no princípio em que moléculas em mistura, aplicadas na superfície ou no sólido, e a fase estacionária fluida (fase estável) se separam enquanto se movem com o auxílio de uma fase móvel (122), utilizado muitas vezes para separar misturas complexas.

A fase estacionária, pode ser líquida ou sólida. Na fase líquida um capilar é recoberto por um líquido pouco volátil, e na fase sólida, a coluna é recoberta por um material sólido, o processo de separação consiste na adsorção (de caráter físico e/ou químico) dos componentes da mistura nesse material. Desta forma, o material da fase estacionária pode aparecer em estados físicos diferentes, mas também em polaridades diferentes. Com isso, ampliando a gama de componentes que podem ser separados e quantificado numa determinada mistura.

No caso da cromatografia gasosa, a fase móvel em questão se trata de um gás, podendo ser: argônio, hélio, nitrogênio, hidrogênio, água, dentre outros. Sendo o He,

o gás de arraste mais utilizado devido a sua inércia, boa condutividade térmica e por ser encontrado facilmente em alta pureza. A fase gasosa deve ser escolhida com o cuidado de possuir o mínimo, ou se possível, nenhuma interação possível com a fase estacionária, isso depende da polaridade da coluna e dos componentes a serem separados.

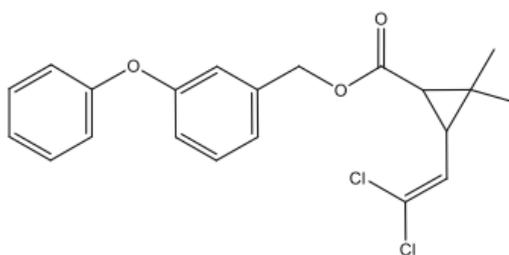
Escolhendo bem todos essas variáveis, a cromatografia gasosa é uma técnica viável por apresentar alta sensibilidade, em torno de  $10^{-12}$  g, com isso necessita somente de pequenas quantidades de amostra para resultados satisfatórios. Destaca-se também pela disponibilidade de uma gama de detectores (captura de elétrons, fotométrico de chama, espectrometria de massas, etc.) que permitem determinar agrotóxicos e/ou seus produtos de degradação em quantidades inferiores aos limites máximos de resíduos (LMR), estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (123).

Nhu-Trang e colaboradores (124), determinaram 400 pesticidas em folhas de chá verde, combinando diferentes procedimentos para obter a melhor separação dos componentes, destes pesticidas estudados 71 deles foram determinados utilizando a cromatografia gasosa. Uma coluna de Sílica foi utilizada como fase estacionária e o Nitrogênio, utilizado como fase móvel. Para reduzir os efeitos de matriz combinou-se a extração QuEChERS (rápida, fácil, barata, eficaz, robusta e segura) e um processo de clean-up através do uso de sorventes, no caso do referido artigo, um cartucho C18 misturado com sílica poliamina (PSA), diminuindo o efeito de matriz e tornando o método mais eficaz, facilitando assim a separação dos picos e aumentando a recuperação, já que evitou o efeito de matriz.

Carazek et.al. (125), determinou 23 pesticidas: alacloro, atrazina, carbofurano, clordano, clorpirifós, paration metila, metolacloro, molinato, pendimetalina, permetrina, profenofos, tebuconazol, terbufos e trifluralina. Utilizou assim como Nhu-Tang, o Nitrogênio como gás de arraste e como fase estacionária uma coluna de HP-5 (5% - fenil-metilpolissiloxano) não polar. A coluna utilizada interagirá com mais intensidade

nas substâncias não-polares, quanto maior a polaridade da substância, nesse caso, menor será o tempo de retenção, pois ficará menos retida na coluna por possuir polaridades distintas. O permetrin, um piretróide, apresentou o maior tempo de retenção, pois analisando sua estrutura (Figura 27) é possível observar que por ser um alceno aromático clorado confere baixa polaridade ao composto, justificando seu maior tempo de retenção na coluna, comparado aos outros pesticidas.

**Figura 27 – Estrutura da Permetrina**



Fonte: Carmo, S.N. do; Mendes, L.D.; et al. *Environmental Science and Pollution Research*, n. 2, 2020.

A estratégia QuEChERS é uma estratégia consolidada e foi proposta em 2003 por Anastassiades et al (126) para determinar resíduos de pesticidas em amostras de vegetais e frutas. Esse procedimento envolve a extração inicial monofásica de 10 g de amostra com 10 mL de acetonitrila, seguida de partição líquido-líquido formada pela adição de 4 g de MgSO<sub>4</sub> anidro mais 1 g de NaCl. A remoção da água residual e a limpeza são realizadas simultaneamente usando um procedimento rápido denominado extração em fase sólida dispersiva (SPE dispersivo), em que 150 mg de MgSO<sub>4</sub> anidro e 25 mg de sorbente de amina secundária primária (PSA) são simplesmente misturados com 1 mL de extrato de acetonitrila.

Com essas etapas é possível explorar as possibilidades oferecidas pela instrumentação analítica. Durante o seu desenvolvimento, grande ênfase foi dada para a obtenção de um procedimento dinâmico, que pudesse ser aplicado em qualquer laboratório (127).

Porém, por se tratar de uma técnica para determinação de multirresíduos a alteração de etapas do método muitas vezes se faz necessária, tornando-o individualizado para determinada combinação de amostra/analito. Em consequência, diversos métodos adaptados do QuECHERS são empregados e etapas dos procedimentos são alteradas, como a correção do pH na etapa de extração, pois as degradações dos pesticidas sofrem influência desse parâmetro, assim como do tipo de solvente, luminosidade, componentes da matriz, temperatura, teor de água e concentração do analito.

Atualmente, a técnica GC-MS é utilizada com frequência para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. A facilidade do acoplamento GC-MS, além da disponibilidade de um banco de espectros de massas padrão obtidos no modo de ionização por impacto de elétrons (Electron Ionization, EI) ajudaram na disseminação da técnica (128).

### **2.1.1. PROTETORES DE ANALITO**

O efeito de matriz é um erro em potencial que merece atenção. Pelo fato da cromatografia se tratar de uma técnica que envolve separação e quantificação de misturas, qualquer erro pode gerar resultados equivocados, alterando taxas de recuperação, precisão e consequentemente de exatidão.

O efeito de matriz pode levar ao aumento da resposta cromatográfica, gerando recuperações maiores que 100% ou pode causar a diminuição da resposta, mascarando o pico do analito, gerando um falso positivo e um falso negativo, respectivamente. Acredita-se que o mascaramento dos sítios ativos ao longo do sistema de GC pelos constituintes da amostra seja o principal mecanismo que leva ao aparecimento do efeito de matriz (129).

Como o aspecto quantitativo é influenciado, a calibração passa a sofrer bastante influência dos efeitos de matriz. No caso do uso do CG-MS, vários tipos de calibração

podem ocorrer, como: calibração externa, *matrix-matched* e adição de padrão. Cada tipo de calibração possui sua particularidade.

A calibração externa apesar de ser a mais simples, é considerada a calibração que mais sofre influência dos efeitos de matriz. A compatibilização da matriz (*matrix-matched*), tenta reproduzir os compostos existentes na amostra em que se quer estudar, porém reproduzir de forma fidedigna a interação de matrizes muito complexas ou matrizes similares que não contenham os analitos, nem sempre é possível. Já, a adição de padrão é uma calibração na qual são adicionadas outras substâncias como os *surrogates*, deuterados ou carbono-13, e possui benefícios com o intuito de mitigar os efeitos de matriz, porém esses padrões isotópicos são caros e possui uma aplicação limitada.

Em alternativa a esses métodos, o uso de alguns compostos que conseguem mascarar as interações indesejadas no sítio cromatográfico é chamado de protetor de analito. Uma substância é considerada um bom analito protetor se a sua eficiência for independente da natureza da matriz, for solúvel no solvente da solução-padrão, não reagir com os agrotóxicos de interesse, não se acumular no sistema cromatográfico e não apresentar o mesmo tempo de retenção dos analitos. Esses compostos devem apresentar grupos polares, como hidroxilas, carboxilas, grupos nitrogenados, etc., para que, ao competirem com os agrotóxicos, sejam predominantemente adsorvidos no insertor, liberando o analito para a coluna cromatográfica (130).

Porém, a principal limitação desta técnica é que os melhores analitos protetores são muito polares, sendo necessária a utilização de solventes, como acetonitrila ou água, para preparar as soluções-padrão, o que limita sua utilização para análises de agrotóxicos apolares por cromatografia gasosa (130).

Em 2003, Anastassiades e colaboradores, demonstrou a combinação de três substâncias: 3-etoxi-1,2-propanodiol, gulonolactona e sorbitol como protetores de analito para uma gama de pesticidas utilizando o CG-MS (131).

Rutkowska et. al. (2019), comparou três abordagens com o objetivo de minimizar os efeitos de matriz, i) calibração matrix-matched, (ii) adição de uma mistura de substâncias como protetor de analito e (iii) injeção no início da sequência. As amostras escolhidas (ervas e frutas secas) foram estudadas devido possui a alta presença de interferentes e ao baixo teor de água. Mais de 256 pesticidas de classes diferentes forma analisados (132).

O estudo referido acima, chegou a conclusão de que independente da abordagem aplicada no método, nenhuma delas chegou a eliminar os efeitos de matriz, ou seja, era possível observar a supressão do sinal do analito. Porém, dentre todas o uso do protetor de analito foi a mais promissora, pois suavizou de forma mais eficiente o efeito de matriz. Isso ocorreu, pois como já foi explicado anteriormente o fato de uma gama dos pesticidas terem características polares, os protetores de analito substituem essas substâncias nos sítios da coluna cromatográfica e passam a permitir a passagem do analito.

### **3. MÉTODO DE EXTRAÇÃO – LOW PARTITION TEMPERATURE**

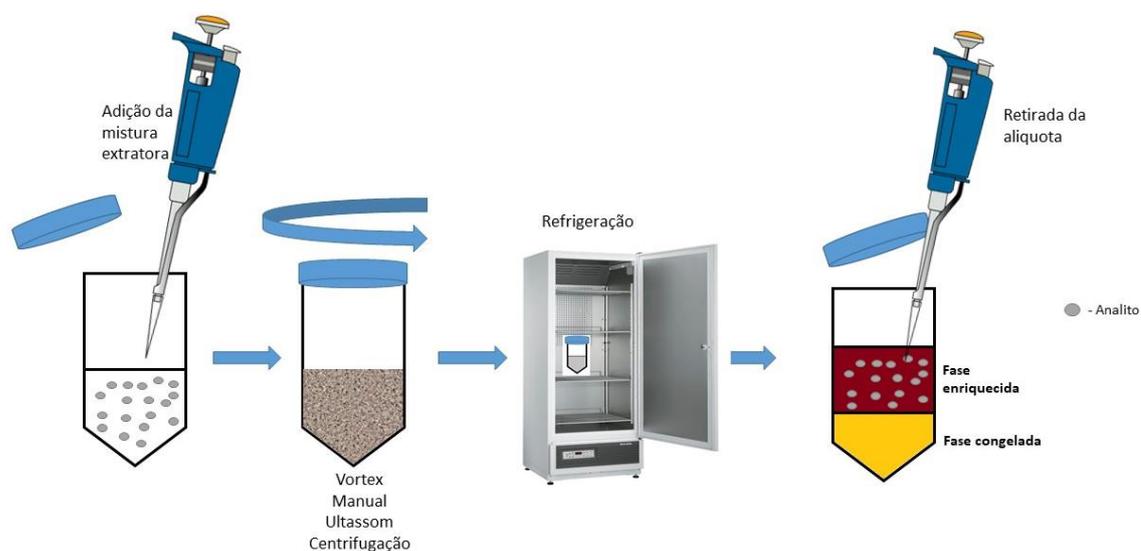
Uma das etapas mais importantes da análise de matrizes utilizando técnicas cromatográficas é a extração. Por se tratarem muitas vezes de matrizes complexas, determinação de analitos em baixa concentração, e influência de efeitos de matriz e espectrais, a extração com ou sem etapas de pré-concentração são importantes e permitem que a análise se torne possível, eficiente e por fim suplante os problemas característicos deste tipo de análise.

Já existem inúmeros métodos de extração consolidados na literatura e utilizados com constância associados a cromatografia, como a extração em fase sólida (SPE), micro extração em fase sólida (SPME), extração em fase líquida (LPE), micro extração em fase líquida (LPME), dentre outros. Independentemente do tipo, todos os métodos de extração têm como objetivo obter uma alíquota da amostra que contenham os

analitos de interesse, se possível livre de interferentes e compatível com a análise cromatográfica desejada.

Apesar do desenvolvimento das técnicas de extração e micro extração em fase sólida, a extração líquido-líquido continua sendo a mais empregada por ser uma técnica simples, que não exige instrumentação sofisticada, e de fácil execução (133). Dito isso, diferentes variações envolvendo essa técnica são utilizadas, uma delas é a Extração líquido-líquido e partição em baixa temperatura (ELL-PBT) (Figura 30).

**Figura 28** – Esquema de extração líquido-líquido e partição em baixa temperatura (ELL-PBT)



Fonte: Própria (2020)

A extração se baseia na partição dos analitos entre as fases aquosa e orgânica inicialmente miscíveis, as quais se separam pela diminuição da temperatura ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) (134). O método foi pela primeira vez utilizado por Juhlert (1997), com o objetivo de determinar pesticidas organofosforados em carnes, empregando temperaturas menores que  $-75^{\circ}\text{C}$ , obtendo resultados satisfatórios para determinação desses analitos por Cromatografia gasosa com Detector de Nitrogênio-Fósforo (CG-NPD) (135).

Lentza-Rizos et. al (136), determinou assim como Juhlert, organofosforados, porém em amostras de azeite de oliva. A principal diferença entre os métodos citados é a utilização da temperatura de -20°C para a partição, o CG-NPD também foi usado como técnica para realizar a determinação dos pesticidas.

Já, de Queiroz e colaboradores (2008), através do Cromatografia Gasosa com Detector por captura de elétrons, determinou cipermetrina e deltametrina em amostras de leite, congelando a mistura de solventes por 12h a -20°C. O método proposto, apresentou boa recuperação e baixos limites de quantificação, indicando que a metodologia proposta é eficiente.

A principal vantagem de usar a partição em baixas temperaturas é principalmente reduzir o tempo de preparo da amostra, pois ao utilizar pequenas quantidades de solvente, poupar a etapa de purificação adicional, ganha-se tempo na sequência analítica. Tornando a análise mais rápida, eficiente e de fácil execução.

#### **4. PARÂMETROS ANALÍTICOS**

A validação de um método perpassa por estabelecer parâmetros analíticos bem definidos, pois é necessário que os dados sejam mais próximos possível do valor real, representando a confiabilidade do ensaio analítico e estabelecendo suas condições de aplicação. No caso em específico do CG-MS é necessária uma atenção especial, por ser uma técnica multielementar e sensível as incertezas, sejam sistemáticas ou aleatórias,

Os parâmetros analisados foram: especificidade e seletividade, limites de detecção e quantificação, repetibilidade (precisão intraensaio), precisão intermediária e exatidão.

Os parâmetros comuns aos dois métodos, estão descritos no capítulo I, tópico 7.

##### **4.1. ESPECIFICIDADE E SELETIVIDADE**

A resolução RE Nº 899, DE 29 DE MAIO DE 2003, da ANIVSA, especificidade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (137),

Para analisar esses aspectos, comparou-se com a literatura os tempos de retenção dos pesticidas estudados, bem como a pureza do sinal, em uma amostra de repolho roxo fortificada com uma solução contendo os pesticidas estudados numa concentração de  $10\mu\text{g L}^{-1}$ .

## **4.2. EXATIDÃO E RECUPERAÇÃO**

A exatidão do método passou por processos de adição e recuperação, na qual as amostras foram fortificadas e submetidas ao processo de extração já descritos anteriormente.

Os intervalos aceitáveis de recuperação para análises de resíduos geralmente estão entre 70% e 120%. Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até  $\pm 15\%$  (138).

## **5. METODOLOGIA**

### **5.1. COLETA DAS AMOSTRAS**

As amostras das diferentes hortaliças foram coletadas em supermercados da cidade de Salvador, Bahia.

### **5.2. PRÉ-TRATAMENTO**

As amostras não foram lavadas e nem passaram por um tratamento prévio, pois a lavagem poderia diminuir ainda mais os teores dos possíveis pesticidas presentes.

### **5.3. PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO - *Low temperature partitioning***

O procedimento escolhido para a extração dos pesticidas das amostras foi adaptado da metodologia descrita no artigo de Costa, et. al. (140), para amostras de feijão.

No caso da metodologia utilizada nesta tese, consistiu na extração de 4g de afalce previamente maceradas com uma combinação de acetato de atila/água (8:1, v/v), essa mistura agitada em vortex por 10 min. Após essa primeira etapa a amostra foi centrifugada por 3 minutos a 300 rpm e levada ao freezer (-20°C) até congelamento, mais ou menos por volta de 3h.

Após o processo de congelamento, o extrato é transferido para um *vial* de 20 mL contendo 1,5 g de sulfato de sódio anidro e agitado por 1 min, uma alíquota deste extrato é retirada e analisada por GC-MS.

Nesse caso também foram preparadas uma amostra controle e amostras fortificadas com 50 µg L<sup>-1</sup> de um mixer dos pesticidas a serem estudados.

#### **5.4. INSTRUMENTAL**

O cromatógrafo usado para realizar a separação dos analitos de interesse é cromatógrafo gasoso, acoplado a um espectrômetro de massa da marca Smimadzu (Tóquio, Japão). Também foram utilizadas a balança analítica SARTORIUS, modelo BLD105.

#### **5.5. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS**

A coluna capilar SGE BP5- MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm de diâmetro) foi utilizada para a separação dos agrotóxicos.

As injeções foram automatizadas, usando injetor do próprio equipamento, em temperatura de 280°C. Como fase móvel o Gás hélio (99,999%) foi utilizado a um fluxo constante de 1,00 mL min<sup>-1</sup>.

A temperatura do forno da coluna foi mantida a 60°C por 1 min, em seguida foi elevada a 200°C, com taxa de aquecimento de 25°C min<sup>-1</sup>, em seguida a 280°C, com taxa de 10 °C min<sup>-1</sup> e finalmente a 300 °C, com taxa de aquecimento de 5°C min<sup>-1</sup>, totalizando 20 min de análise.

A aquisição dos dados foi realizada no modo SIM com faixa de varredura de 40-650 m/z, e a voltagem do detector foi estabelecida em 1,85 Kv. Os analitos foram identificados por comparação do espectro de massa obtido na análise, com o espectro de referência da livreria NIST disponível no próprio equipamento.

## 5.6. PESTICIDAS DETERMINADOS

Os pesticidas a serem determinados estão descritos no quadro a seguir, com os tempos de retenção e a razão massa/carga (m/z) usados para identificação dos picos no cromatograma, através do método SIM.

**Quadro 6** - Pesticidas determinados em alface

Compostos	TR	m/z 1	m/z 2	m/z 3	m/z 4
Carbofuran	6,14	164	131	109	221
Molinate	7,55	126	55	187	83
Sulfotep	8,24	322	97	238	202
Dimethoate	8,65	87	93	125	229
Diazinon	9,05	137	179	125	199
Disulfoton	9,22	88	60	97	274
Chlorothalonil	9,28	266	264	268	265
Methyl Parathion	9,83	109	125	93	263
Fenitrothion	10,24	109	125	277	260
Chorpyrifos	10,46	97	197	199	350
Fenthion	10,47	278	169	109	125
Parathion	10,59	291	97	109	139
Imazalil	11,91	173	215	175	279
Ethion	12,7	231	97	153	384
Cyproconazole	12,45	139	222	125	376
Tebuconazole	13,65	250	126	125	307
Bifenthrin	14,14	181	166	165	422
L- Chyalothrin I	14,86	181	197	208	449
L- Chyalothrin II	15,05	181	197	208	449

Permethrin I	15,94	183	165	163	391
Permethrin II	16,07	183	165	163	391
Difenoconazole I	18,66	265	267	323	406
Difenoconazole II	18,75	265	267	323	406
Deltamethrin	19,06	181	253	255	505
Azoxystrobin	19,21	344	388	372	403

## 5.7. REAGENTES E SOLUÇÕES

Os padrões dos pesticidas foram pesados e diluídos em acetato de etila para uma concentração de 1000 mg L<sup>-1</sup>. Desta forma, foram preparadas soluções estoque que continham todos os pesticidas, variando as concentrações finais a depender da sensibilidade do detector para cada substância, finalizando com concentrações entre 10 e 20 mg L<sup>-1</sup>. Todas as soluções foram armazenadas em um freezer a uma temperatura de aproximadamente -20°C.

Os padrões da solução estoque, foram injetados individualmente em cromatógrafo a gás acoplado ao detector de massa (CG/MS) no modo SCAN, com o objetivo de obter o tempo de retenção e os íons de identificação de cada pesticida estudado.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO ELL-EBT

Inicialmente, foram testadas diferentes metodologias publicadas em artigos recentes visando a extração de pesticidas em amostras de hortaliças. A princípio foi testada a metodologia para extração de pesticidas em folhas de chá, publicada por Wu (2017), (141). Esse procedimento consistiu em transferir aproximadamente 4,00000 g de amostra para um tubo falcon de vidro de 10 mL e adicionar 8 mL de acetone. A amostra foi agitada por vortex por 10 min e em seguida, o extrato foi

transferido para um outro vial headspace de 20 mL contendo 0,5 g de acetato de sódio e 1,5 de sulfato de sódio. O extrato foi agitado novamente em vortex e o extrato resultante foi passado por um cartucho de florisil para etapa de clean up. Duas amostras de repolho foram preparadas usando essa metodologia.

Uma amostra controle (sem adição de padrão) e um *spike* (onde foi adicionado uma alíquota de uma solução mista de pesticidas na concentração de  $50 \mu\text{g L}^{-1}$ ). As duas amostras foram injetadas no sistema GC-MS para comparação e avaliação da viabilidade do procedimento. Como resultado, foi verificado que nenhum composto foi detectado na amostra controle e no *spike*, mostrando que neste caso a metodologia publicada não foi adequada para extração de pesticidas em hortaliças.

Em função destes resultados, foi testada uma segunda metodologia, publicada por Costa et al. (2015) (140). Para testar essa metodologia foi utilizada uma amostra de alface. Essa amostra foi triturada em pistilo e almofariz até formar uma pasta. Neste caso também foram preparadas uma amostra controle e um *spike* nas mesmas concentrações usadas para o repolho. Todas as etapas desta metodologia foram descritas no tópico 5.3.

A escolha dos solventes extratores é de extrema importância para que a extração utilizando baixas temperaturas tenha êxito. Segundo, Lehotay et. al, a acetonitrila, o acetato de etila e a acetona são os solventes mais utilizados em análises multirresíduos para determinação de pesticidas (142), pois além de servirem como solventes de eluição ainda estão envolvidos na etapa de limpeza da amostra pós extração, justificando a escolha do acetato de etila como fase orgânica.

A combinação dos solventes extratores acetato de atila/água, é explicada pela influência da polaridade quando se trata de separação cromatográfica, a adição da água aumenta um pouco a polaridade da solução extratora, favorecendo a extração de pesticidas mais polares, ainda que no final da corrida cromatográfica. Pois substâncias apolares irão eluir mais rapidamente que substâncias polares, já que a

característica da fase estacionária (SGE BP5- MS) é polar, fazendo com que substâncias polares tenham maior interação com a coluna.

A agitação por vortex se faz necessária, pois aumenta o contato da amostra com a solução extratora, e a agitação de 10 min se mostrou suficiente. Além disso, a centrifugação também se mostrou eficaz, sedimentando o material pastoso da hortaliça de forma mais rápida.

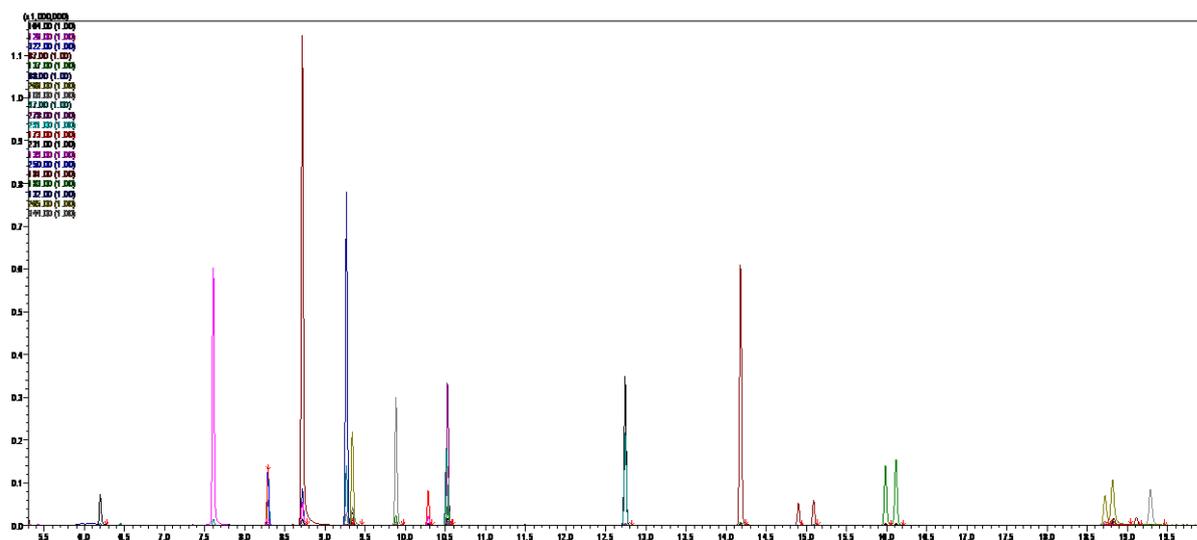
Em seguida, a intenção de realizar esse processo do congelamento, faz com que a fase aquosa congele, retendo os possíveis interferentes existentes. Enquanto isso, os pesticidas são extraídos pela fase orgânica, sem necessidade de limpeza e de outras etapas, tornando o processo de extração mais rápido.

A adição do sulfato de sódio anidro, aumenta a força iônica do meio, e por interagir com a água diminui a sua solubilidade de analitos mais polares pela fase aquosa. Desta forma, esses analitos migram para fase orgânica, melhorando a recuperação dos pesticidas mais polares.

## **6.2. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA**

Usando a análise em CG-MS (SCAN), para obter o espectro de massa, selecionar o íon de maior intensidade e identificar o tempo de retenção dos analitos, foi realizado o spike da amostra de repolho com uma solução contendo uma mistura dos pesticidas de interesse. O método SCAN analisa todos os íons presentes na amostra, fazendo uma varredura das massas, analisando a massa dos analitos num determinado intervalo (73).

**Figura 29** – Cromatograma obtido pelo método de varredura SCAN



No apêndice A encontram-se a seleção dos picos, utilizando como referência a biblioteca de existente no próprio equipamento, analisando todos os íons produzidos na solução.

Os íons selecionados para cada composto foram separados de todos os demais íons produzidos a partir da fragmentação completa do analito em estudo, utilizando o modo SIM (do inglês Select Ion Monitoring). No apêndice B encontram-se os Espectros de massas dos pesticidas presentes na mistura, neste caso detectados pelo método SIM.

## 6.2. PARÂMETROS ANALÍTICOS

### 6.2.1. CURVA DE CALIBRAÇÃO EXTERNA X PROTETOR DE ANALITO

De modo geral, a calibração mais simples é aquela que utiliza a padronização externa, porém apesar desta vantagem, sofre mais com os efeitos de matriz. Pelo fato da amostra ser complexa e ao analisar as curvar de calibração externa, observou uma baixa sensibilidade e perda de linearidade, indicando a presença de interferências.

Desta forma, optou-se por utilizar o protetor de analito com o intuito de reduzir essas interferências, melhorando perfil do pico, aumentando a sensibilidade e

linearidade. Favorecendo melhor precisão e exatidão dos resultados, potencializando a confiabilidade dos resultados.

Uma combinação de etilglicerol, gulonolactona e sorbitol, numa concentração 10, 1 e 1 mgL<sup>-1</sup>, respectivamente foram usadas como protetores de analito. Essas substâncias bem como as concentração, foram baseadas no artigo de Anastassiades et. al. (143). Apesar de atentarem para o risco de uma indesejada “caramelização” no interior do cromatógrafo, foi demonstrado que alguns açúcares e derivados lactonas apresentaram bons resultados para vários praguicidas (129).

O uso destas substâncias como agentes de proteção se deve ao fato de serem solúveis na solução final, pelo ter alta volatilidade do etilenoglicerol reduzindo o risco de contaminação do sistema e por camuflar os sítios ativos da coluna cromatográfica, mitigando a interação indesejada do interferente.

A tabela abaixo indica os valores dos coeficientes de determinação das curvas com o uso do protetor de analito, parâmetro considerado para indicar a linearidade dos resultados.

**Tabela 12** - Equação de reta dos pesticidas com uso do protetor de analito

Compostos	Equação de reta	R <sup>2</sup>
Carbofuran	$y = 3376,9x + 449,88$	0,9967
Molinate	$y = 20123x + 190,16$	0,9968
Sulfotep	$y = 7469,7x - 250,75$	0,9991
Dimethoate	$y = 19170x - 6029,2$	0,9975
Diazinon	$y = 12591x - 2867,3$	0,9936
Disulfoton	$y = 21503x - 4534,7$	0,9975
Chlorothalonil	$y = 13021x + 4371$	0,9976
Methyl Parathion	$y = 7570,3x + 7144,5$	0,9967
Fenitrothion	$y = 6873,2x + 1223,7$	0,9986
Chorpyrifos	$y = 6562,4x - 197,28$	0,9986
Fenthion	$y = 18932x - 4332,5$	0,9972
Parathion	$y = 2179,9x + 165,67$	0,9993
Imazalil	$y = 5961,1x - 1734,4$	0,9984
Ethion	$y = 10900x + 3424$	0,9979

Cyproconazole	$y = 13658x - 5502,6$	0,9989
Tebuconazole	$y = 8596,5x - 1132,1$	0,9994
Bifenthrin	$y = 33671x - 404,99$	0,9987
L- Chyalothrin I	$y = 3623,5x + 333,07$	0,9989
L- Chyalothrin II	$y = 3310,6x + 738,78$	0,9977
Permethrin I	$y = 9690x - 736,51$	0,9982
Permethrin II	$y = 12274x + 774,8$	0,9984
Pyraclostrobin	$y = 17726x - 779,66$	0,9993
Difenoconazole I	$y = 3994,9x + 1276$	0,9952
Difenoconazole II	$y = 7048,9x - 8772,1$	0,9969
Deltamethrin	$y = 995,62x + 572,55$	0,9952
Azoxystrobin	$y = 895,14x + 119,15$	0,9967

Vale ressaltar que os valores de equação de reta e coeficientes foram obtidos numa curva com protetor de analito, de  $0,25 \mu\text{g L}^{-1}$  a  $11 \mu\text{g L}^{-1}$ . Todos os coeficientes estão dentro dos valores considerados satisfatórios.

## 6.2.2. LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

Segue abaixo a tabela que apresenta os LD e LQ em  $\mu\text{g L}^{-1}$  dos pesticidas estudados.

**Tabela 13** - Limites de detecção e quantificação

Compostos	Equação de reta	LD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
Carbofuran	$y = 3376,9x + 449,88$	0,24	0,80
Molinate	$y = 20123x + 190,16$	0,22	0,72
Sulfotep	$y = 7469,7x - 250,75$	0,12	0,38
Dimethoate	$y = 19170x - 6029,2$	0,23	0,77
Diazinon	$y = 12591x - 2867,3$	0,60	1,90
Disulfoton	$y = 21503x - 4534,7$	0,22	0,73
Chlorothalonil	$y = 13021x + 4371$	0,19	0,62
Methyl Parathion	$y = 7570,3x + 7144,5$	0,28	0,93
Fenitrothion	$y = 6873,2x + 1223,7$	0,18	0,59
Chorpyrifos	$y = 6562,4x - 197,28$	0,16	0,52
Fenthion	$y = 18932x - 4332,5$	0,21	0,71
Parathion	$y = 2179,9x + 165,67$	0,10	0,34
Imazalil	$y = 5961,1x - 1734,4$	0,17	0,58
Ethion	$y = 10900x + 3424$	0,18	0,59
Cyproconazole	$y = 13658x - 5502,6$	0,15	0,51

Tebuconazole	$y = 8596,5x - 1132,1$	0,10	0,32
Bifenthrin	$y = 33671x - 404,99$	0,13	0,44
L- Chyalothrin I	$y = 3623,5x + 333,07$	0,14	0,48
L- Chyalothrin II	$y = 3310,6x + 738,78$	0,22	0,74
Permethrin I	$y = 9690x - 736,51$	0,16	0,54
Permethrin II	$y = 12274x + 774,8$	0,15	0,51
Difenoconazole I	$y = 3994,9x + 1276$	0,40	1,34
Difenoconazole II	$y = 7048,9x - 8772,1$	0,30	1,00
Deltamethrin	$y = 995,62x + 572,55$	0,36	1,20
Azoxystrobin	$y = 895,14x + 119,15$	0,30	1,00

Os limites de detecção e quantificação foram considerados satisfatórios e em consonância com dados da literatura. Como o artigo de Chen e colaboradores (144), na qual foram avaliados a presença de diferentes pesticidas, incluindo alguns estudados nesta tese, como: Bifetrin, Clorpyrifos, Metil paration e Paration, utilizando um Cromatógrafo a gás com detecção por captura de elétrons, o LD obtido foi de 0,01 mg Kg<sup>-1</sup>, enquanto no caso dos dados obtidos e mostrados na tabela acima, os valores de LD e LQ foram menores para os mesmo pesticidas estudados. Este comportamento se deve ao fato do detector utilizado ser mais sensível, o MS, além da combinação do uso do protetor de analito e da extração em baixas temperaturas, aumentando a extração do pesticida, reduzindo interferências e consequentemente levando a melhores limites de detecção e quantificação.

### 6.2.3. PRECISÃO

A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas. A precisão foi avaliada ao nível de repetibilidade (precisão intra-dia) e precisão intermediária (precisão inter-dia).

**Tabela 14 - Precisão inter-dia e intra-dia (continua)**

Compostos	Precisão (%RSD)	
	Inter-dia	Intra-dia

Carbofuran	16,0	11,4
Molinate	8,9	8,2
Sulfotep	13,1	13,5
Dimethoate	11,5	15,5
Diazinon	8,7	8,6
Disulfoton	7,7	8,8
Chlorothalonil	21,4	16,1
Methyl Parathion	8,9	8,7
Fenitrothion	10,5	10,9
Chorpyrifos	18,5	10,4
Fenthion	7,3	8,1
Parathion	13,5	13,9
Imazalil	9,9	9,8
Ethion	8,7	8,9
Cyproconazole	6,3	2,7

Tabela 15 – Precisão inter-dia e intra-dia (conclusão)

Compostos	Precisão (%RSD)	
	Inter-dia	Intra-dia
Tebuconazole	10,9	9,5
Bifenthrin	11,4	10,8
L- Chyalothrin I	10,9	9,0
L- Chyalothrin II	11,5	10,4
Permethrin I	8,7	10,3
Permethrin II	10,5	10,2
Difenoconazole I	14,4	13,9
Difenoconazole II	14,5	18,5
Deltamethrin	23,4	9,5
Azoxystrobin	20,6	18,3

Como a concentração da amostra está em níveis baixos (<1ppb), é aceito que o desvio padrão relativo pode ser aceito até 30%, segundo os critérios sugeridos pela AOAC e pelo INMETRO (61). Desta forma, ambas estão dentro dos parâmetros estabelecidos indicando a precisão do método.

#### 6.2.4. RECUPERAÇÃO DOS PESTICIDAS

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro, calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança (145) .

A exatidão do método cromatográfico foi avaliada através dos ensaios de recuperação. A recuperação calcula a quantidade de analito que foi encontrada no extrato final, após passar por todas as etapas do procedimento, em relação a quantidade presente/adicionada na amostra.

**Tabela 16** - Recuperações obtidas a partir da fortificação da amostra de alface fresca com 2, 5 e 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  de pesticida.

Pesticidas	Fortificação		
	2 $\mu\text{g L}^{-1}$	7 $\mu\text{g L}^{-1}$	10 $\mu\text{g L}^{-1}$
Taxa de recuperação (%)			
Carbofuran	112	113	91
Molinate	78	75	88
Sulfotep	75	82	94
Dimethoate	94	95	85
Diazinon	72	89	79
Disulfoton	111	104	107
Chlorothalonil	72	88	99
Methyl Parathion	70	75	87
Fenitrothion	89	93	103
Chorpyrifos	77	102	112
Fenthion	89	85	100
Parathion	87	93	109
Imazalil	113	96	111
Ethion	79	97	120
Cyproconazole	99	87	94
Tebuconazole	84	110	115

Bifenthrin	108	120	93
L- Chyalothrin I	110	96	113
L- Chyalothrin II	105	99	102
Permethrin I	95	106	101
Permethrin II	118	106	96
Pyraclostrobin	72	75	73
Difenoconazole I	119	83	109
Difenoconazole II	72	102	111
Deltamethrin	84	94	92
Azoxystrobin	77	110	116

É de se esperar que quanto maior for a concentração da solução fortificada, maior seja a recuperação encontrada, sendo possível observar de forma geral esse padrão na recuperação dos pesticidas estudados.

Compostos que não são afetados pelo efeito de matriz são considerados termicamente estáveis, apresentam um limitado potencial de adsorção no injetor em temperaturas elevadas e a matriz é incapaz de providenciar um efeito protetor significativo. As taxas de recuperação aparentemente mais altas e com baixa precisão são observadas em análises de agrotóxicos mais polares, sendo o grau de polaridade classificado de acordo com a solubilidade em água ou  $K_{ow}$  (coeficiente de partição octanol/água) (146). Isso explica o fato dos pesticidas dissulfoton, imazilalil, bifettrin, L- Chyalothrin I e II, Permetrin I e II apresentarem em geral uma maior taxa de recuperação nos três níveis de fortificação, acima de 100%.

Compostos contendo grupamentos  $-P=O$  (organofosforados),  $-O-CO-NH-$  (carbamatos),  $-OH$  (hidroxilados),  $-N=$  (imidazoles e benzimidazoles),  $-NH-CO-NH-$  (derivados da uréia) são mais susceptíveis ao efeito de matriz (147) e por isso podem apresentar menores taxas de recuperação abaixo do 90%, como no caso do sulfotep, dimetioato, diazinon, metil paration, etion e fenitrotion.

Os piretróides, apesar de serem menos polares, apresentam efeito de matriz significativo. Neste caso, a elevada massa molar dos agrotóxicos (acima de 400 g mol<sup>-1</sup>), como no caso do deltametrin, que apresenta massa molar de 505 mg L<sup>-1</sup>, dificulta a volatilização e menor quantidade de analito é introduzida na coluna cromatográfica quando preparado em solvente puro, produzindo menores respostas (148).

Ha o intervalo aceitável de recuperação para análise de resíduos, que deve variar de 70% a 120%, situação encontrada para todos os agrotóxicos estudados. Como todos os valores de recuperação ficaram entre esse intervalo, indica que o método é exato e possui confiabilidade analítica.

### 6.3. APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS REAIS

Foram realizadas as análises de duas amostras de alfaces coletadas em mercados diferentes da cidade de Salvador, Bahia, em dezembro de 2020.

**Tabela 17** - Concentração dos pesticidas em amostras de alface (n=3)

Compostos	$\bar{X} \pm \sigma$ (mg Kg <sup>-1</sup> )	
	AA1	AA2
Carbofuran	<LD	<LD
Molinate	0,872 ± 0,037	0,120 ± 0,0198
Sulfotep	N/D	N/D
Dimethoate	0,946 ± 0,028	0,946 ± 0,015
Diazinon	4,359 ± 0,561	4,900 ± 0,015
Disulfoton	4,815 ± 1,514	0,710 ± 0,2413
Chlorothalonil	<LD	<LD
Methyl Parathion	<LD	<LD
Fenitrothion	N/D	N/D
Chorpyrifos	1,975 ± 0,003	2,742 ± 0,385
Fenthion	N/D	N/D
Parathion	N/D	N/D
Imazalil	N/D	N/D
Ethion	N/D	N/D
Cyproconazole	N/D	N/D
Tebuconazole	N/D	N/D
Bifenthrin	14,614 ± 0,149	12,205 ± 0,9430

L- Chyalothrin I	N/D	N/D
L- Chyalothrin II	1,161 ± 0,173	1,231 ± 0,236
Permethrin I	17,873 ± 3,181	14,904 ± 1,763
Permethrin II	N/D	N/D
Difeconazole I	N/D	N/D
Difeconazole II	N/D	N/D
Deltamethrin	N/D	N/D
Azoxystrobin	N/D	N/D

\*N/D = não detectado

A escolha do alface para realizar a aplicação deste método consistiu no fato de que dentre as hortaliças, o alface apresenta um dos maiores índices de contaminação por agrotóxicos (149) e por ser a hortaliça folhosa mais consumida no País (150)

Dos vinte e cinco pesticidas estudados, três apresentaram concentrações abaixo do limite de detecção e treze não foram detectados, indicando a não presença dessas substâncias nas amostras. Uma delas é o difenoconazol que apesar de ser um pesticida permitido para a cultura em questão, com Limite de Resíduo Máximo (LMR) de 0,5 mg Kg<sup>-1</sup>, não foi detectado em ambas as amostras analisadas.

Cada cultura apresenta uma grade de pesticidas permitidos para serem usados na plantação, no caso da alface são ao total sessenta e três agrotóxicos permitidos, segundo o Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2019). Dos pesticidas que foram detectados e quantificados, somente a bifetrina e a permetrina são substâncias permitidas pelo MAPA para a cultura de hortaliças folhosas, ambos os agrotóxicos são classificados como classe II – muito perigoso. No caso, da bifetrina os níveis detectados (14,6 e 12,2 mg Kg<sup>-1</sup>) foram aproximadamente de 24 e 28 vezes superiores ao LMR permitido (0,5 mg Kg<sup>-1</sup>). Já os níveis de permetrina ultrapassaram 150 a 170 vezes o permitido (0,1 mg Kg<sup>-1</sup>). Valores semelhantes foram encontrados por Oviedo e colaboradores (2003), na qual encontrou níveis elevados de bifetrina e permetrina em amostras de tomate e de alface acima do permitido (151).

Encontrar pesticidas que não fazem parte da lista dos permitidos ou se permitidos acima do LMR faz sentido, pois dentro do cenário de estímulo ao uso desse tipo de

substância cada vez mais agricultores lançam mão dessa estratégia para lidar com o controle de pragas. O próprio Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA, analisou centenas de amostras de vários estados brasileiros entre 2017 e 2020 e encontrou amostras que apresentavam pesticidas não permitidos e/ou em concentração acima do permitido (152).

## **7. CONSIDERAÇÕES PARCIAIS**

Através desta metodologia foi possível quantificar com confiabilidade uma gama de 25 pesticidas de diferentes classes orgânicas, através da adaptação de um método de extração utilizando baixas temperaturas.

Os níveis de LD e LQ indicam que é possível determinar os pesticidas em baixas concentrações.

Os valores de coeficiente de determinação indicaram uma linearidade satisfatória indicando boa correlação do sinal analítico e da concentração.

Os valores de precisão e recuperação, sinalizam que o método desenvolvido é robusto, preciso e exato.

Foram encontrados pesticidas com níveis acima do permitido pela legislação regulamentadora e pesticidas que são proibidos para a cultura desse tipo de hortaliça folhosa.

Portanto o uso deste método é promissor por ter reduzido o tempo de preparo e extração, facilitando sua aplicabilidade em laboratório e com possibilidade de uso em matrizes semelhantes a estudada neste trabalho.

## **8. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Analisando o que foi discutido nesta tese, fica claro a gama de possibilidades ao trabalhar com amostras de origem vegetal, podendo analisar a composição mineral e como o método de cocção influencia na disponibilidade destes minerais. E aplicar métodos de análise multivariada para reconhecer e confirmar a existência de padrões dentre as amostras de caráter semelhante.

Além disso, no segundo capítulo foi possível desenvolver um método adaptado, para determinação de diferentes pesticidas, indicando outra possibilidade de estudo das hortaliças.

## REFERÊNCIAS

- 1 Satia, J.A.; Kristal, A.R.; et al. Psychosocial factors and dietary habits associated with vegetable consumption. **Nutrition**, v. 18, n. 3, p. 247–254, 2002.
- 2 Arruda, S.F. A Importância Dos Minerais Na Alimentação. **Aditivos e ingredientes**, p. 30–41, 2012.
- 3 Favell, D.J. A comparison of the vitamin C content of fresh and frozen vegetables. **Food Chemistry**, v. 62, n. 1, p. 59–64, 1998.
- 4 Anvisa Resíduos de agrotóxicos em alimentos. **Rev Saúde Pública**, v. 40, n. 2, p. 361–363, 2006.
- 5 Nejadgholi, I.; Bolic, M. A comparative study of PCA, SIMCA and Cole model for classification of bioimpedance spectroscopy measurements. **Computers in Biology and Medicine**, v. 63, p. 42–51, 2015.
- 6 ANVISA Resolução CNNPA nº 12, de 1978. **BRASIL**, p. 49–51, 1978.
- 7 World Health Organization Fruit and vegetable promotion initiative/a meeting report. **Report of the meeting**, p. 29, 2003.

- 8 Moretti, C.L.; Oliveira, D.A. de; et al. A importância nutricional das hortaliças. **Embrapa Hortaliças**, p. 16, 2012.
- 9 WHO Cardiovascular diseases (CVDs). v. Fact sheet, p. 317, 2011.
- 10 Guilbert, J.J. The world health report 2002 - reducing risks, promoting healthy life. **Education for health (Abingdon, England)**, v. 16, n. 2, p. 230, 2003.
- 11 Mattioli, A.V.; Francesca, C.; et al. Fruit and vegetables in hypertensive women with asymptomatic peripheral arterial disease. **Clinical Nutrition ESPEN**, v. 27, p. 110–112, 2018.
- 12 Ferreira, B.; Barra, F. Hortaliça Mostarda. p. 9–10,
- 13 John, R.; Ahmad, P.; et al. Heavy metal toxicity: Effect on Plant growth, biochemical parameters and metal accumulation by Brassica juncea L. **International Journal of Plant Production**, v. 3, n. 3, p. 65–75, 2009.
- Gamito, J.L.C. (2010). A Cultura da Chicória para “Café” (*Cichorium intybus* L.) na Região do Ribatejo.
- 15 Bergantin, C.; Maietti, A.; et al. Bioaccessibility and HPLC-MS/MS chemical characterization of phenolic antioxidants in Red Chicory (*Cichorium intybus*). **Journal of Functional Foods**, v. 33, p. 94–102, 2017.
- 16 Carazzone, C.; Mascherpa, D.; et al. Identification of phenolic constituents in red chicory salads (*Cichorium intybus*) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionisation tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 138, n. 2–3, p. 1062–1071, 2013.
- 17 Tardugno, R.; Pozzebon, M.; et al. Polyphenolic profile of *Cichorium intybus* L. endemic varieties from the Veneto region of Italy. **Food Chemistry**, v. 266, n. September 2017, p. 175–182, 2018.
- 18 Lordêlo, M.; Silva, C.; et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v. 31, n. 3, p. 669–682, 2010.
- 19 Taco Tabela brasileira de composição de alimentos. **NEPA - Unicamp**, p. 161, 2011.
- 20 Shergill-Bonner, R. Micronutrients. **Paediatrics and Child Health**, v. 23, n. 8, p. 331–336, 2013.
- 21 BRASIL Bário. **CETESB**, 2013.

- 22 Harvey, L.J. **Calcium : Properties and Determination**. Elsevier Ltd., 2016.
- 23 Verma, C.; Tapadia, K.; et al. Determination of iron (III) in food, biological and environmental samples. **Food Chemistry**, n. November, 2016.
- 24 Lo, A. Potassium : Properties and Determination. p. 439–445, 2016.
- 25 Intake, M. Magnesium – An Essential Mineral. p. 587–592, 2016.
- 26 Bazanelli, Ana Paula; Cupparin, L. Sódio. **ILSI Brasil**, v. 4, 2009.
- 27 Monteiro, T.H.H.V. Fósforo. **ILSI Brasil**, v. 15, 2010.
- 28 Brasil, F.I. Dossiê: os minerais na alimentação. **Food Ingredients Brasil**, n. 4, p. 48–65, 2008.
- 29 Rocha, N.; Caroline, A.; et al. Perdas Vitamínicas Durante o Tratamento Térmico de Alimentos. **Cient Ciênc Biol Saúde**, p. 121–128, 2012.
- 30 Prodanov, M.; Sierra, I.; et al. Influence of soaking and cooking on the thiamin, riboflavin and niacin contents of legumes. **Food Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 271–277, 2004.
- 31 Zhong, X.; Dolan, K.D.; et al. Effect of steamable bag microwaving versus traditional cooking methods on nutritional preservation and physical properties of frozen vegetables: A case study on broccoli (*Brassica oleracea*). **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 31, p. 116–122, 2015.
- 32 Bureau, S.; Mouhoubi, S.; et al. Are folates, carotenoids and vitamin C affected by cooking? Four domestic procedures are compared on a large diversity of frozen vegetables. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 735–741, 2015.
- 33 Santos, A.M.P. dos; Lima, J.S.; et al. Determination and Evaluation Employing Multivariate Analysis of the Mineral Composition of Broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *Italica*). **Food Analytical Methods**, v. 6, n. 3, p. 745–752, 2013.
- 34 Ahvenainen, R. New approaches in improving the shelf life of minimally processed fruit and vegetables. **Trends in Food Science and Technology**, v. 71, n. June, p. 179–187, 1996.
- 35 Ferreira, M.M.C. Quimiometria: Conceitos, métodos e aplicações. **Editora da Unicamp**, 2015.
- 36 Reis, M.M. dos; Ferreira, M.M.C. Separação de espectros simulados e de luminescência total através do método generalizado de anulação do posto ( GRAM ).

**Química Nova**, v. 22, n. February, p. 11–17, 1999.

37 Cebi, N.; Yilmaz, M.T.; et al. A rapid ATR-FTIR spectroscopic method for detection of sibutramine adulteration in tea and coffee based on hierarchical cluster and principal component analyses. **Food Chemistry**, v. 229, p. 517–526, 2017.

38 Elizabeth M. Masko, Emma H. Allott, and S.J.F. The Relationship Between Nutrition and Prostate Cancer: Is More Always Better? v. 63, n. 5, p. 810–820, 2014.

39 Sena, M.M. De; Poppi, R.J.; et al. Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análise de solos. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 547–556, 2000.

40 Fernández Pierna, J.A.; Vincke, D.; et al. Use of a multivariate moving window PCA for the untargeted detection of contaminants in agro-food products, as exemplified by the detection of melamine levels in milk using vibrational spectroscopy. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 152, p. 157–162, 2016.

41 VICINI, L.; MENDONÇA SOUZA, A. Análise multivariada da teoria à prática. **Monografia**, p. 215, 2005.

42 Kumar, N.; Bansal, A.; et al. Chemometrics tools used in analytical chemistry: An overview. **Talanta**, v. 123, p. 186–199, 2014.

43 Cargnelutti Filho, A.; Ribeiro, N.D.; et al. Comparação de métodos de agrupamento para o estudo da divergência genética em cultivares de feijão. **Ciência Rural**, v. 38, n. 8, p. 2138–2145, 2008.

44 Linden, R. Técnicas de Agrupamento. **Revista de Sistemas de Informação da FSMA**, v. 4, p. 18–36, 2009.

45 Yim, O.; Ramdeen, K.T. Hierarchical Cluster Analysis: Comparison of Three Linkage Measures and Application to Psychological Data. **The Quantitative Methods for Psychology**, v. 11, n. 1, p. 8–21, 2015.

46 Sousa, R.A. De; Neto, W.B.; et al. Classificação de água de coco processada e natural por meio de HCA, PCA e teores de íons metálicos determinados por ICP OES. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 654–656, 2006.

47 Nisgoski, S.; Oliveira, A.A. de; et al. Artificial neural network and SIMCA classification in some wood discrimination based on near-infrared spectra. **Wood Science and Technology**, v. 51, n. 4, p. 929–942, 2017.

48 Nguyen, H.T.; Lee, D.K.; et al. UPLC-QTOFMS based metabolomics followed by stepwise partial least square-discriminant analysis (PLS-DA) explore the possible relation between the variations in secondary metabolites and the phylogenetic

divergences of the genus *Panax*. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1012–1013, p. 61–68, 2016.

49 Alladio, E.; Giacomelli, L.; et al. Development and validation of a Partial Least Squares-Discriminant Analysis (PLS-DA) model based on the determination of ethyl glucuronide (EtG) and fatty acid ethyl esters (FAEEs) in hair for the diagnosis of chronic alcohol abuse. **Forensic Science International**, v. 282, p. 221–230, 2018.

50 Diniz, P.H.G.D.; Gomes, A.A.; et al. Simultaneous Classification of Teas According to Their Varieties and Geographical Origins by Using NIR Spectroscopy and SPA-LDA. **Food Analytical Methods**, v. 7, n. 8, p. 1712–1718, 2014.

51 Karabagias, I.K.; Louppis, A.P.; et al. Characterization and classification of commercial thyme honeys produced in specific Mediterranean countries according to geographical origin, using physicochemical parameter values and mineral content in combination with chemometrics. **European Food Research and Technology**, v. 243, n. 5, p. 889–900, 2017.

52 Pisano, P.L.; Silva, M.F.; et al. Anthocyanins as markers for the classification of Argentinean wines according to botanical and geographical origin. Chemometric modeling of liquid chromatography-mass spectrometry data. **Food Chemistry**, v. 175, p. 174–180, 2015.

53 Belhumeur, P.N.; Hespanha, J.P.; et al. Eigenfaces vs. fisherfaces: Recognition using class specific linear projection. **IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence**, v. 19, n. 7, p. 711–720, 1997.

54 Varella, C.A.A. ANÁLISE MULTIVARIADA APLICADA AS CIÊNCIAS AGRÁRIAS. **Nostas de aula INF 766**, v. Departamen, n. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, p. 1–32, 2013.

55 In: MEYERS, R.A. Inductively coupled plasma/ optical emission Spectrometry. **Encyclopedia of analytical chemistry**, p. 9468- 9485., 2000.

56 Naghipour, D.; Abbasi, M.; et al. The concentration data of heavy metals in vegetables of Guilan province , Iran. **Data in Brief**, v. 21, p. 1704–1708, 2018.

57 Fadigas, J.C.; Santos, A.M.P. dos; et al. Use of multivariate analysis techniques for the characterization of analytical results for the determination of the mineral composition of kale. **Microchemical Journal**, v. 96, n. 2, p. 352–356, 2010.

58 Xiao, Z.; Codling, E.E.; et al. Microgreens of Brassicaceae: Mineral composition and content of 30 varieties. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 49, n. October 2017, p. 87–93, 2016.

59 Souza, H.C. de; Santos, A.M.P. dos; et al. Determination of the mineral composition of watercress and data evaluation using multivariate analysis. **Analytical Letters**, v. 44, n. 10, p. 1758–1768, 2011.

60 O. Thompson, M.; Ellison, S. L. R.; Wood, R. ISO/IEC 17025. **Pure Appl. Chem.**, v. 74, p. 835, 2002.

BRASIL (2016). ORIENTAÇÃO SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS. **INMETRO**, 21.

62 Martins, V.S.; Jesus, R.M. De; et al. Determination and evaluation of the mineral composition of obi (Cola acuminata). **Biological Trace Element Research**, v. 143, n. 1, p. 478–488, 2011.

63 Santos, A.M.P. dos; Oliveira, A.C.; et al. Determination and Evaluation of the Mineral Composition of Chinese Cabbage (Beta vulgaris). **Food Analytical Methods**, v. 4, n. 4, p. 567–573, 2011.

64 CAMARGO, Érika Barbosa; BOTELHO, R.A.T. Técnica Dietética: Seleção e Preparo de alimentos. **São Paulo: Atheneu**, 2005.

65 DeJesus, R.M.; Junior, M.M.S.; et al. Validation of a digestion system using a digester block/cold finger system for the determination of lead in vegetable foods by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Journal of AOAC International**, v. 94, n. 3, p. 942–946, 2011.

66 Shariff, R.; Achary, A.A.; et al. Analytical Method Validation and Determination of Iron and Phosphorus in Vegetable Oil by Inductively Coupled Plasma–Mass Spectrometry with Microwave Assisted Digestion. **Analytical Letters**, v. 51, n. 11, p. 1774–1788, 2018.

67 MENEZES, E.W.; GIUNTINI, E.B.; LAJOLO, F.. . A questão da variabilidade e qualidade de dados de composição de alimentos. **J. Brazilian Soc. Food Nutr.**, v. 26, p. 63–76, 2003.

68 MALAVOLTA, E. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. n: **MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. Avaliação do estado nutricional de plantas: princípios e aplicações. 2. ed. ver. e atual. Piracicaba: Potafos**, 1997.

69 Furlani, A.M.C.; Furlani, P.R.; et al. Composição mineral de diversas hortaliças. **Bragantia**, v. 37, n. 1, p. 33–44, 1978.

70 Pes, L.Z.; Hilgert, M.A. **Fisiologia Vegetal**. Santa Maria: 2015.

- 71 Ana Claudia R. N. Barboza, Camila V. M. S. Cruz, Marcelo B. Graziani, Myrian C. F. Lorenzetti, E.S. AQUECIMENTO EM FORNO DE MICROONDAS / DESENVOLVIMENTO DE ALGUNS CONCEITOS FUNDAMENTAIS. **Química Novamica Nova**, v. 24, n. 6, p. 901–904, 2001.
- 72 CARVALHO, R.P. de. Temas Atuais de Física: Micro-ondas. **Sociedade Brasileira de Física**, v. São Paulo, n. 1, 2005.
- 73 Torrão, S.; Cipriano, S.; et al. Processamento Geral de Alimentos - Microondas. **Escola Superior Agrária**, n. Instituto Politecnico de Coimbra, 2010.
- 74 Mengel, K. and Kirkby, E.A. Principles of plant nutrition. **Annals of Botany**, v. 93, n. 4, p. 479–480, 2004.
- 75 Method, S.; Requirements, P.; et al. Appendix F : Guidelines for Standard Method Performance Requirements. 2016.
- 76 Padovani, R.M.; Amaya-Farfán, J.; et al. Dietary reference intakes: Application of tables in nutritional studies. **Revista de Nutricao**, v. 19, n. 6, p. 741–760, 2006.
- 77 BRASIL RDC 269/2005: Regulamento Técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. **ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, p. 6, 2005.
- 78 WHO Dieta alimentar, Nutrição e Prevenção de Doenças crónicas. **Organização Mundial da Saúde**, n. 4–5, 2003.
- 79 Martínez-Pineda, M.; Yagüe-Ruiz, C.; et al. Reducción del contenido de potasio de las judías verdes y las acelgas mediante el procesado culinario. Herramientas para la enfermedad renal crónica. **Nefrología**, v. 36, n. 4, p. 427–432, 2016.
- 80 Copetti, C.; Oliveira, V.R. de; et al. Avaliação da redução de potássio em hortaliças submetidas a diferentes métodos de cocção para possível utilização na dietoterapia renal. **Revista de Nutricao**, v. 23, n. 5, p. 831–838, 2010.
- 81 Souza, C.T. de; Soares, S.A.R.; et al. Determination and evaluation of the mineral composition of breadfruit (*Artocarpus altilis*) using multivariate analysis technique. **Microchemical Journal**, v. 128, p. 84–88, 2016.
- 82 Mahan, L.K.; Escott-Stump, S.; et al. **Alimentos, nutricao e dietoterapia**. Elsevier, 2015.
- 83 Nascimento, L.; Melnyk, A. A química dos pesticidas no meio ambiente e na saúde. **Artigo Revista Mangaio Acadêmico**, v. 1, n. 1, p. 54–61, 2016.

- 84 Smith, A.G.; Gangolli, S.D. Organochlorine chemicals in seafood: Occurrence and health concerns. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 6, p. 767–779, 2002.
- 85 Patussi, C.; Bündchen, M. In situ genotoxicity evaluation of triazines using Tradescantia clone 4430 Trad-SHM bioassay. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 18, n. 4, p. 1173–1178, 2013.
- 86 Chung, S.W.C. How effective are common household preparations on removing pesticide residues from fruit and vegetables? A review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 8, p. 2857–2870, 2018.
- 87 Prestes, O.D.; Friggi, C.A.; 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. **Quimica Nova**, v. 32, n. 6, p. 1620–1634, 2009.
- 88 Linders, J.; Mensink, H.; et al. Foliar interception and retention values after pesticide application: a proposal for standardised values for environmental risk assessment. **Pest Management Science**, v. 58, n. 3, p. 315–315, 2002.
- 89 Willis, G.H.; McDowell, L.L. **Pesticides persistence on foliage**. 1987.
- 90 Alves, S.R.; Silva, J.J.O. **Avaliação de ambientes contaminados por agrotóxicos**. 2003.
- 91 Flores, A.V.; Ribeiro, J.N.; et al. Organoclorados: um problema de saúde pública. **Ambiente & Sociedade**, v. 7, n. 2, p. 111–124, 2004.
- 92 Nunes, M.V.; Tajara, E.H. Efeitos tardios dos praguicidas organoclorados no homem. **Revista de Saude Publica**, v. 32, n. 4, p. 372–382, 1998.
- 93 BRASIL PORTARIA Nº 329, DE 02 DE SETEMBRO DE 1985 O. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abasteciment**, p. 2018, 1998.
- 94 Singh, B.K.; Walker, A. Microbial degradation of organophosphorus compounds. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 3, p. 428–471, 2006.
- 95 Santos, V.M.R. Dos; Donnici, C.L.; et al. Compostos organofosforados pentavalentes: Histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. **Quimica Nova**, v. 30, n. 1, p. 159–170, 2007.
- 96 Cavaliere, M.J.; Calore, E.E.; et al. Miotoxicidade por organofosforados. **Revista de Saude Publica**, v. 30, n. 3, p. 267–272, 1996.
- 97 Sousa, F.V. de; Resende, F.A.; et al. Intoxicação por compostos

organosfosforados e síndrome Intermediária. **Rev Med Minas Gerais**, v. 19, p. 50–57, 2009.

98 Colovic, M.B.; Krstic, D.Z.; et al. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. **Current Neuropharmacology**, v. 11, n. 3, p. 315–335, 2013.

99 Aparecida, M.; Coelho, M.; et al. Intoxicação Exógena Por Carbamato Conhecido Popularmente Como “ Chumbinho ”. p. 792–794, 1998.

100 Tramuja FF, Fávaro LF, Pauka LM, S. de A.H. ASPECTOS REPRODUTIVOS DO PEIXE-ZEBRA, *Danio rerio*, EXPOSTO A DOSES SUBLETAIS DE DELTAMETRINA (Reproductive aspects of zebrafish, *Danio rerio*, exposed to sublethal doses of deltamethrin). **Archives of Veterinary Science**, v. 11, n. 1, p. 48–53, 2006.

101 Montanha, F.P.; Pimpão, C.T. Efeitos toxicológicos de piretróides (cipermetrina e deltametrina) em peixes. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 9, n. 18, p. 58, 2012.

102 Velíšek, J.; Jurčíková, J.; et al. Effects of deltamethrin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 23, n. 3, p. 297–301, 2007.

103 Nogueira, F. da S.; Araujo, F.M.; et al. Azole fungicides: Occurrence and fate in wastewater and surface waters. **Food Chemistry**, v. 42, n. 3, p. 1–10, 2020.

104 Riise, G.; Lundekvam, H.; et al. Loss of pesticides from agricultural fields in SE Norway - Runoff through surface and drainage water. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 26, n. 2, p. 269–276, 2004.

105 Eduardo, V.; Almeida, S. De; et al. Agrotóxicos em hortaliças: segurança alimentar, riscos socioambientais e políticas públicas para promoção da saúde. **Tempus. Actas em Saúde Coletiva**, v. 4, n. 4, p. 84–99, 2009.

106 Bartlett, D.W.; Clough, J.M.; et al. The strobilurin fungicides. **Pest Management Science**, v. 58, n. 7, p. 649–662, 2002.

107 OLIVEIRA, K. das G.B. de; COBUCCI, T.; et al. EFEITO DE APLICAÇÃO DE ESTROBILURINA NA PRODUTIVIDADE DO FEIJOEIRO COMUM. **Documentos, IAC**, v. 85, p. 1404–1407, 2008.

108 Hooser, E.A.; Belden, J.B.; et al. Acute toxicity of three strobilurin fungicide formulations and their active ingredients to tadpoles. **Ecotoxicology**, v. 21, n. 5, p. 1458–1464, 2012.

- 109 Li, D.; Liu, M.; et al. Strong lethality and teratogenicity of strobilurins on *Xenopus tropicalis* embryos: Basing on ten agricultural fungicides. **Talanta**, v. 216, n. January, p. 868–874, 2016.
- 110 Lopes, C.V.A.; Albuquerque, G.S.C. de Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde em Debate**, v. 42, n. 117, p. 518–534, 2018.
- 111 BRASIL LEI Nº 7.802, de 11 de Julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos r. p. 1–7, 1989.
- 112 Mariana Corrêa Netto A legislação ambiental brasileira e o uso de agrotóxicos proibidos no exterior: permissibilidade da lei ou falta de efetividade? **Universidade Federal Fluminense**, 2011.
- 113 Miyake, S.; Hirakawa, Y.; et al. Simultaneous Detection of Six Different Types of Pesticides by an Immunosensor Based on Surface Plasmon Resonance. **Analytical sciences : the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry**, v. 36, n. 3, p. 335–340, 2020.
- 114 Nogueira, F. da S.; Araujo, F.M.; et al. Simultaneous determination of strobilurin fungicides residues in bean samples by HPLC-UV-AD using boron-doped diamond electrode. **Talanta**, v. 216, n. January, p. 120957, 2020.
- 115 Lu, S.H.; Li, S.S.; et al. The rapid quantitative analysis of three pesticides in cherry tomatoes and red grape samples with Tchebichef image moments. **Food Chemistry**, v. 290, n. March, p. 72–78, 2019.
- 116 ALOthman, Z.A.; Yilmaz, E.; et al. Development of combined-supramolecular microextraction with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry procedures for ultra-trace analysis of carbaryl in water, fruits and vegetables. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 00, n. 00, p. 1–11, 2020.
- 117 Hojjati, M.; Haghghi, T. Determination of Organic Sulfur Contaminants Using Hollow Fibre-protected Liquid-phase Micro-extraction Coupled with Gas Chromatography. **Anal. Bioanal. Chem. Res**, v. 7, n. 1, p. 33–48, 2020.
- 118 Farajzadeh, M.A.; Mohebbi, A.; et al. A new and facile method for preparation of amorphous carbon nanoparticles and their application as an efficient and cheap sorbent for the extraction of some pesticides from fruit juices. **Microchemical Journal**, v. 155, n. March, p. 104795, 2020.

- 119 Ozcan, C.; Balkan, S. Multi-residue determination of organochlorine pesticides in vegetables in Kirklareli, Turkey by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 72, n. 7, p. 761–769, 2017.
- 120 Komatsu, E.; Vaz, M. OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE EXTRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE PESTICIDAS EM AMOSTRAS DE ÁGUA EMPREGANDO MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 720–724, 2004.
- 121 Chullasat, K.; Huang, Z.; et al. Bubble-in-drop microextraction of carbamate pesticides followed by gas chromatography-mass spectrometric analysis. **Microchemical Journal**, v. 155, p. 104666, 2020.
- 122 Coskun, O. Separation Techniques: Chromatography. **Northern Clinics of Istanbul**, v. 3, n. 2, p. 156–160, 2016.
- 123 Erney, D.R.; Gillespie, A.M.; et al. Explanation of the matrix-induced chromatographic response enhancement of organophosphorus pesticides during open tubular column gas chromatography with splitless or hot on-column injection and flame photometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 638, n. 1, p. 57–63, 1993.
- 124 Ly, T.K.; Ho, T.D.; et al. Determination of 400 pesticide residues in green tea leaves by UPLC-MS/MS and GC-MS/MS combined with QuEChERS extraction and mixed-mode SPE clean-up method. **Food Chemistry**, v. 326, n. April, p. 126928, 2020.
- 125 Carmo, S.N. do; Mendes, L.D.; et al. Determination of pesticides of different chemical classes in drinking water of the state of Santa Catarina (Brazil) using solid-phase microextraction coupled to chromatographic determinations. **Environmental Science and Pollution Research**, n. 2, 2020.
- 126 Anastassiades, M.; Lehotay, S.J.; et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and. **Journal of AOAC International**, v. 86, p. 412–431, 2003.
- 127 Prestes, O.D.; Friggi, C.A.; 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, n. 6, p. 1620–1634, 2009.
- 128 Leandro, C.C.; Fussell, R.J.; et al. Determination of priority pesticides in baby foods by gas chromatography tandem quadrupole mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1085, n. 2, p. 207–212, 2005.
- 129 Lara Cristina Teixeira Soares, Á.J. dos S.-N. Protetores de analitos e efeito de

matriz em GC. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 2, p. 58–71, 2012.

130 Pinho, G.P.; Neves, A.A.; et al. Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 987–995, 2009.

131 Anastassiades, M.; Maštovská, K.; et al. Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides. **Journal of Chromatography A**, v. 1015, n. 1–2, p. 163–184, 2003.

132 Rutkowska, E.; Łozowicka, B.; et al. Three approaches to minimize matrix effects in residue analysis of multiclass pesticides in dried complex matrices using gas chromatography tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 279, n. December 2018, p. 20–29, 2019.

133 Vieira, H.P.; Neves, A.A.; et al. Otimização e validação da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) para piretróides em água e análise por CG. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 535–540, 2007.

134 Pinho, G.P. de; Neves, A.A.; et al. Optimization of the liquid-liquid extraction method and low temperature purification (LLE-LTP) for pesticide residue analysis in honey samples by gas chromatography. **Food Control**, v. 21, n. 10, p. 1307–1311, 2010.

135 Juhler, R.K. Optimized method for the determination of organophosphorus pesticides in meat and fatty matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 786, n. 1, p. 145–153, 1997.

136 Lentza-Rizos, C.; Avramides, E.J.; et al. Low-temperature clean-up method for the determination of organophosphorus insecticides in olive oil. **Journal of Chromatography A**, v. 912, n. 1, p. 135–142, 2001.

137 Ministério da Saúde -MS Agência Nacional de Vigilância Sanitária -ANVISA Resolução – Re N° 899, De 29 De Maio De 2003. **Diário Oficial da União**, v. 2003, 2003.

138 Ribani, M.; Jardim, I C S F.; Melo, L.F.C.. VALIDAÇÃO EM MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS E ELETROFORÉTICOS Marcelo. **Materials Science and Engineering C**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

139 Pedott, A.H.; Fogliatto, F.S. Estudos de repetitividade e reprodutividade para dados funcionais. **Production**, v. 23, n. 3, p. 548–560, 2012.

140 Costa, A.I.G.; Queiroz, M.E.L.R.; et al. Determination of pesticides in lettuce using solid – liquid extraction with low temperature partitioning. **FOOD CHEMISTRY**, v. 181, p. 64–71, 2015.

141 Wu, C.C. Multiresidue method for the determination of pesticides in Oolong tea using QuEChERS by gas chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 229, p. 580–587, 2017.

142 Maštovská, K.; Lehotay, S.J. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, v. 1040, n. 2, p. 259–272, 2004.

143 Maštovská, K.; Lehotay, S.J.; et al. Combination of analyte protectants to overcome matrix effects in routine GC analysis of pesticide residues in food matrixes. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 24, p. 8129–8137, 2005.

144 Chen, C.; Qian, Y.; et al. Evaluation of pesticide residues in fruits and vegetables from Xiamen, China. **Food Control**, v. 22, n. 7, p. 1114–1120, 2011.

145 BRAZIL Resolução – Re Nº 899, De 29 De Maio De 2003. **Ministério da Saúde -MS Agência Nacional de Vigilância Sanitária -ANVISA**, v. 2003, 2003.

146 Klotz, W.L.; Schure, M.R.; et al. Determination of octanol-water partition coefficients of pesticides by microemulsion electrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 930, n. 1–2, p. 145–154, 2001.

147 Hajšlová, J.; Holadová, K.; et al. Matrix-induced effects: A critical point in the gas chromatographic analysis of pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, v. 800, n. 2, p. 283–295, 1998.

148 Sánchez-Brunete, C.; Albero, B.; et al. Determination of pesticide residues by GC-MS using analyte protectants to counteract the matrix effect. **Analytical Sciences**, v. 21, n. 11, p. 1291–1296, 2005.

149 ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA): relatório das amostras analisadas no período de 2017-2018. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA Plano Plurianual 2017-2020 – Ciclo 2017/2018**, p. 136, 2019.

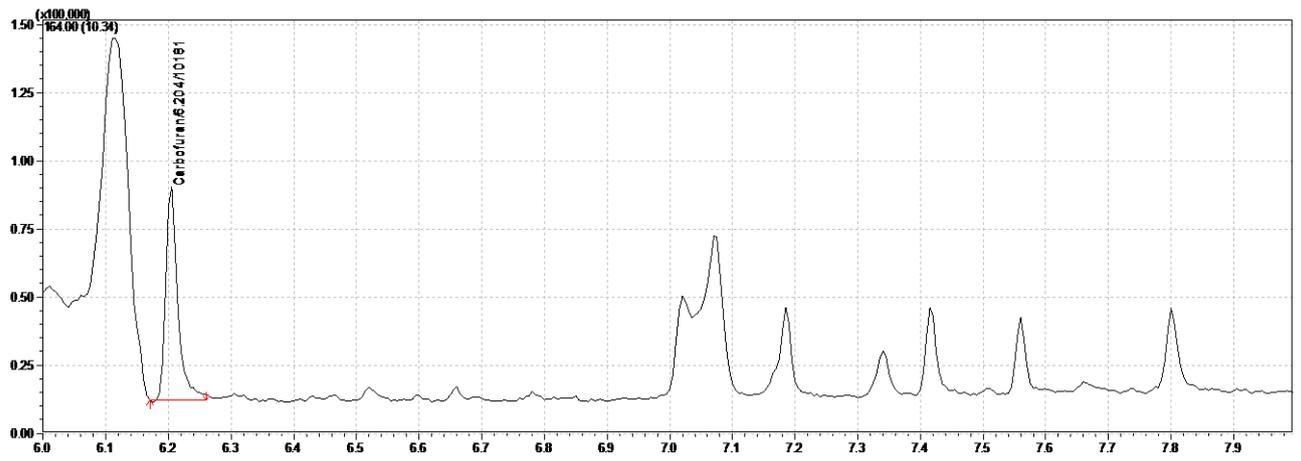
Organization), F. (Food and A. (2003). Agricultural database. *FAO (Food and Agriculture Organization)*.

151 OVIEDO, M.T.P.; TOLEDO, M.C.D.F.; et al. Resíduos De Agrotóxicos Piretróides Em Hortaliças. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 9–18, 2003.

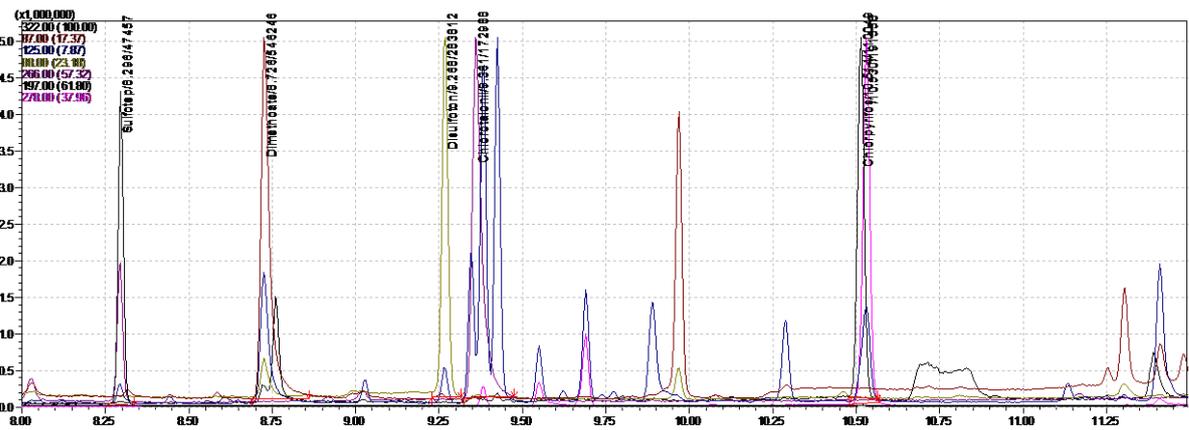
Guimarães, J.A. (2019). Grade de agrotóxicos registrados para o manejo fitossanitário em hortaliças folhosas, inflorescências e condimentares no Brasil. - *Brasília, DF: Embrapa Hortaliças*.

## **APÊNDICE**

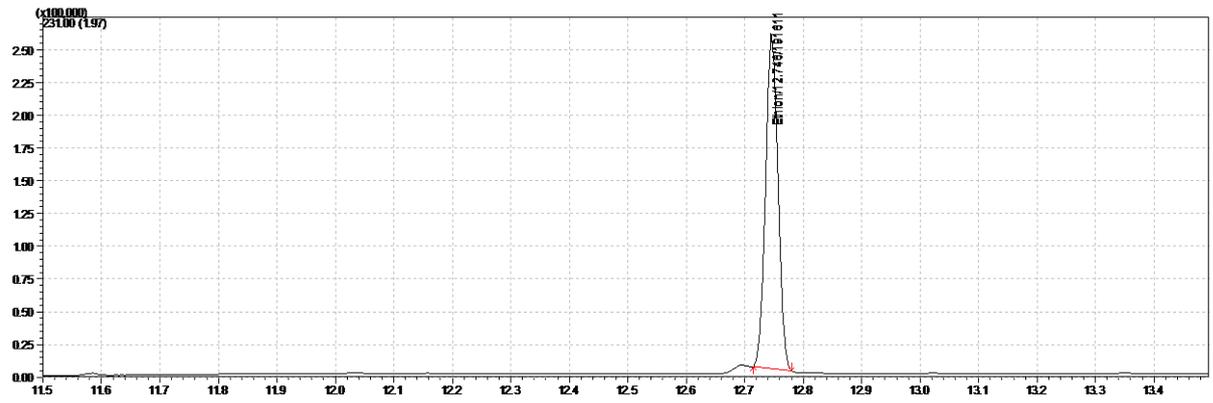
**APÊNDICE A – Cromatograma em método SCAN para os pesticidas no intervalo de 6 a 8 minutos**



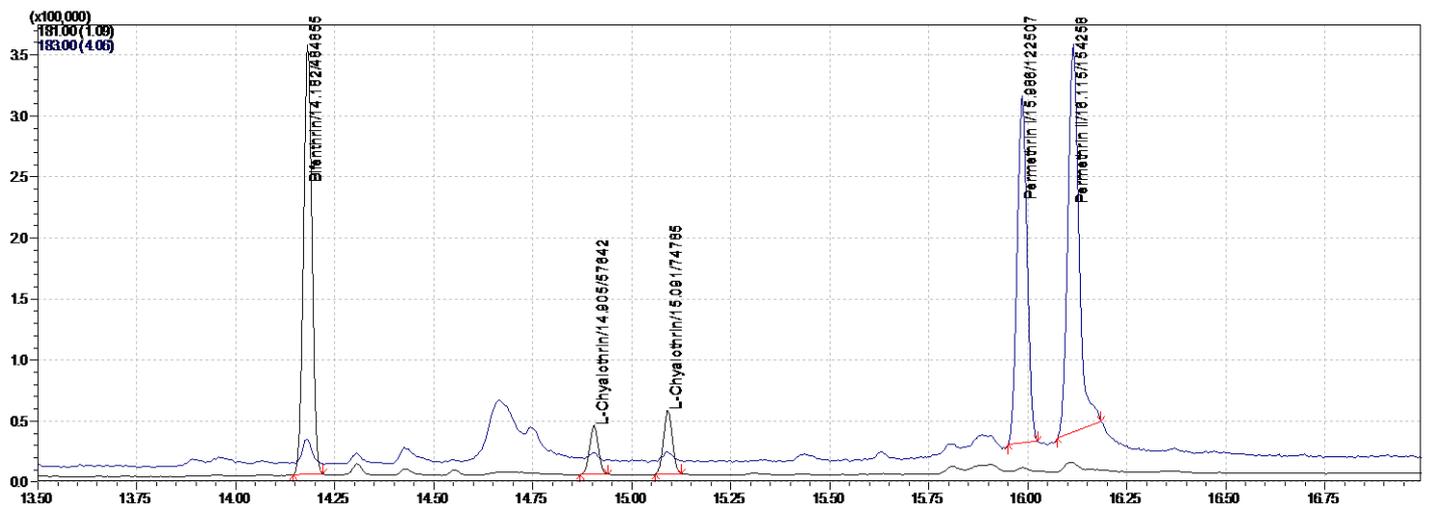
Cromatograma em método SCAN para os pesticidas no intervalo de 8 a 11,45 minutos



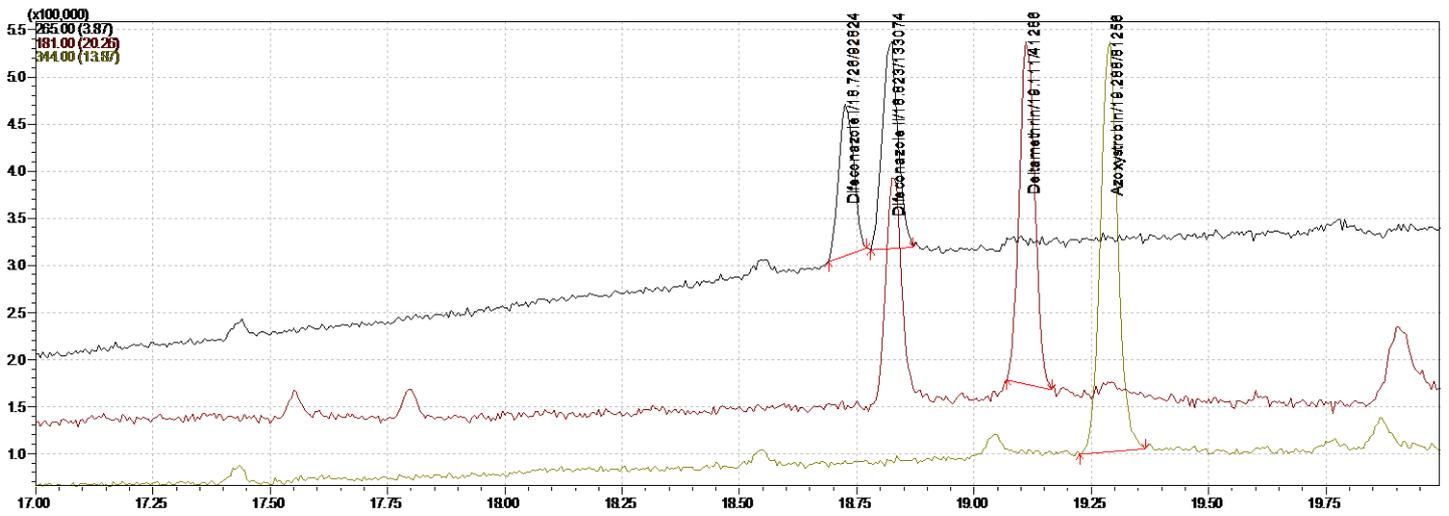
Cromatograma em método SCAN para os pesticidas no intervalo de 11,45 a 13,5 minutos



Cromatograma em método SCAN para os pesticidas no intervalo de 13,5 a 17 minutos

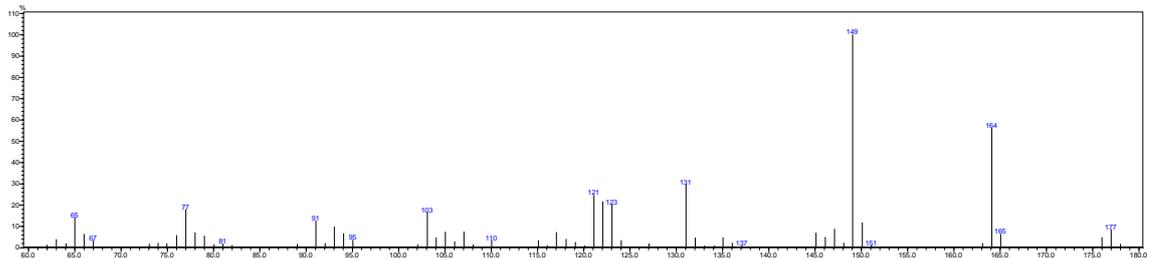


## Cromatograma em método SCAN para os pesticidas no intervalo de 17 a 20 minutos

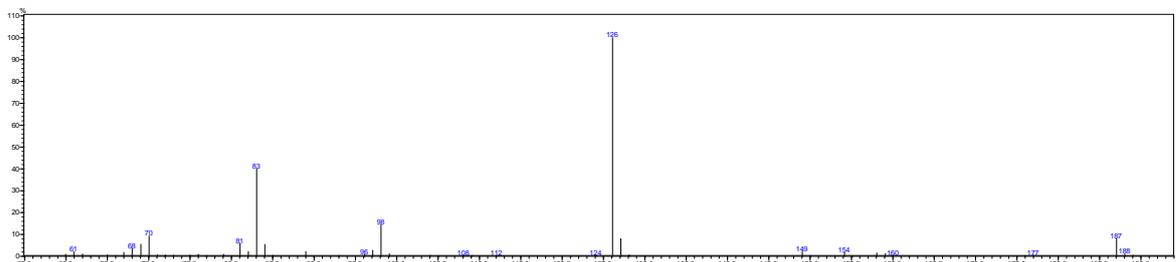


## APÊNDICE B – Espectros em método SCAN para os pesticidas identificados

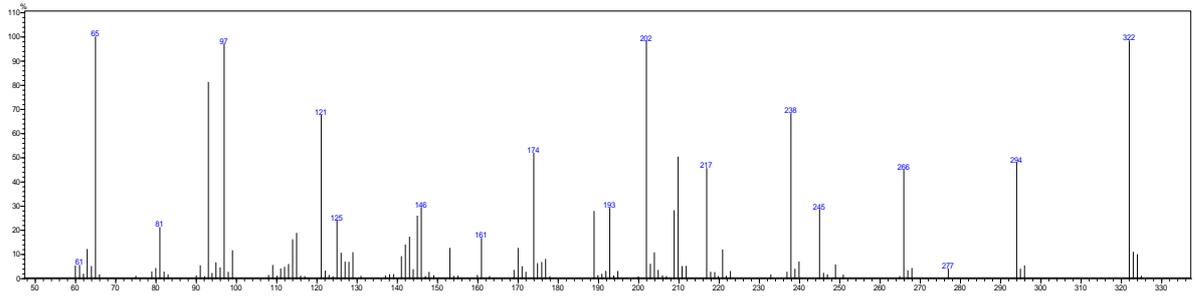
### Carbofuran



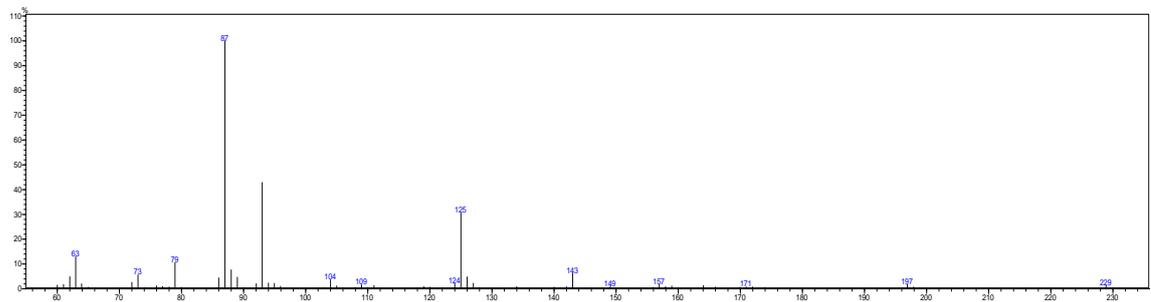
### Molinato



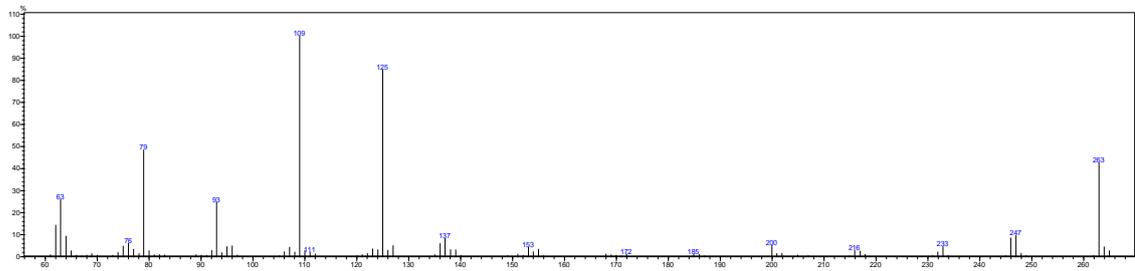
### Sulfotep



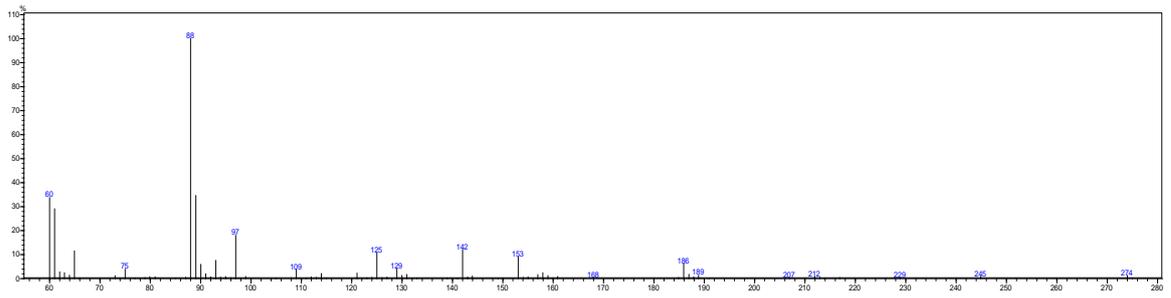
### Dimetoato



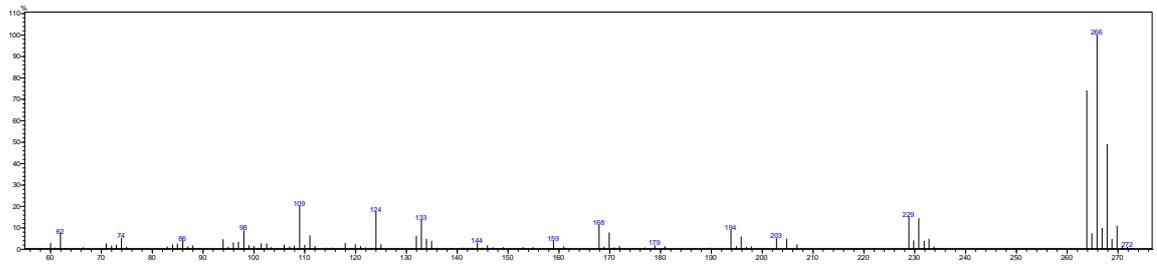
### Metil Paration



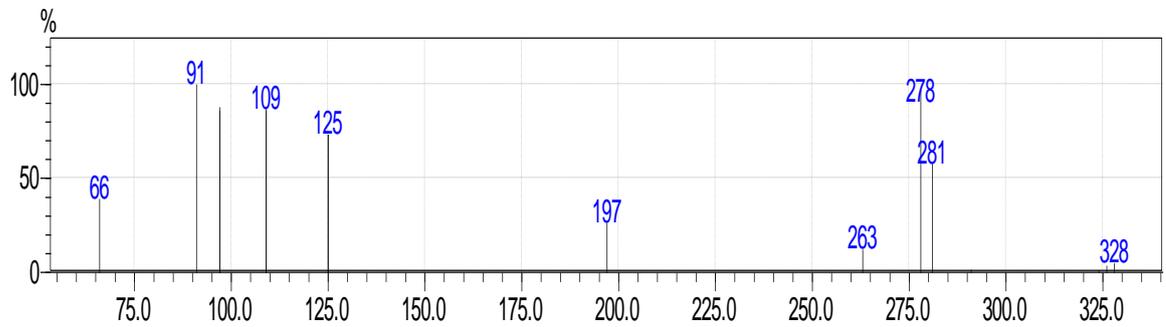
### Disulfoton



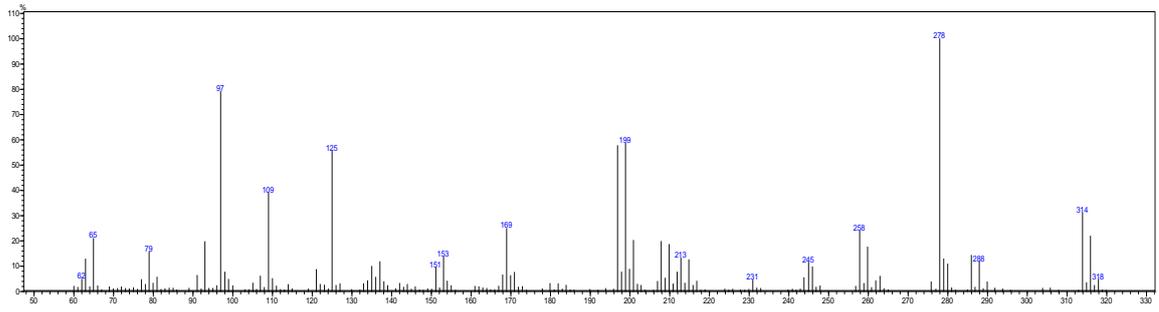
### Clorotalonil



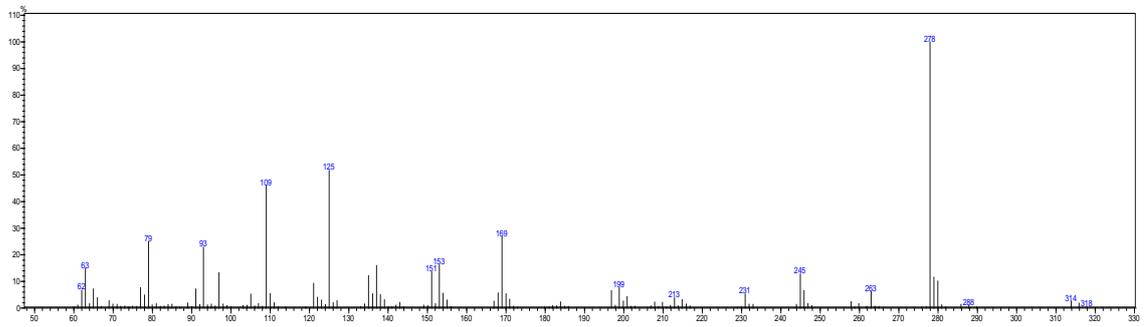
### Fenitrotion



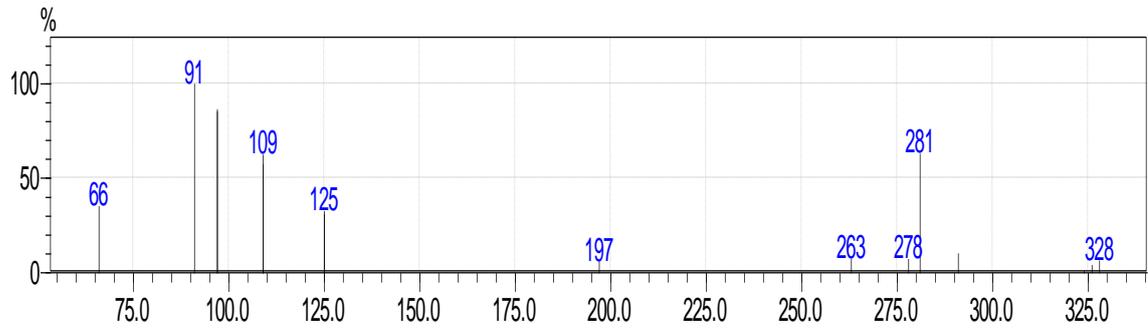
### Clorpirifós



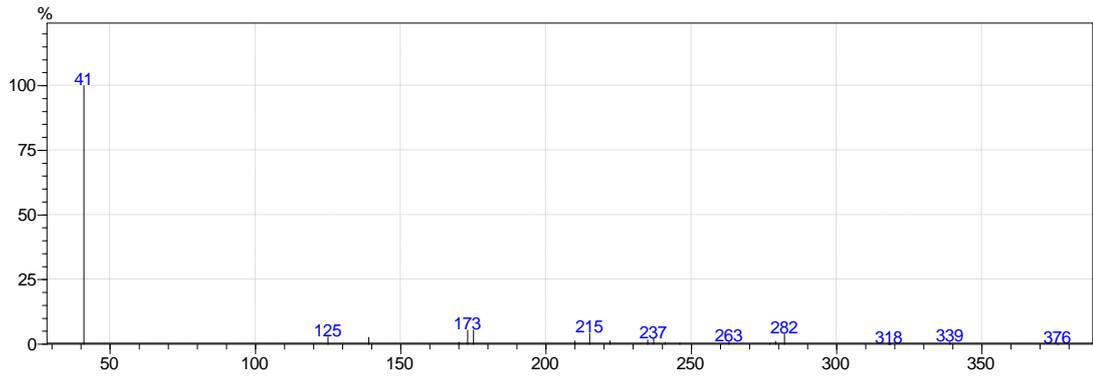
### Fention



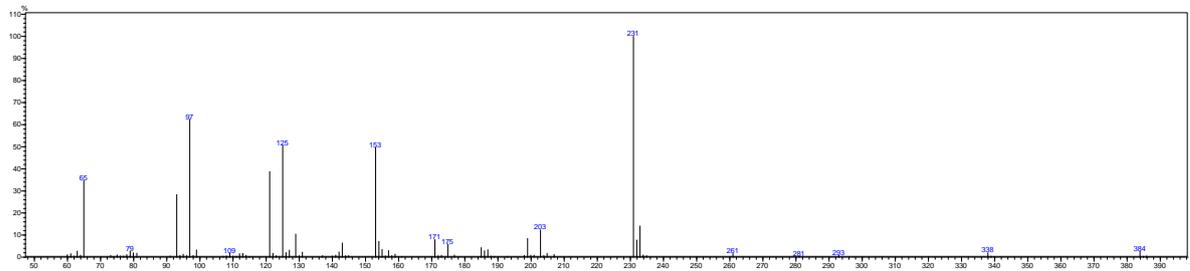
### Paration



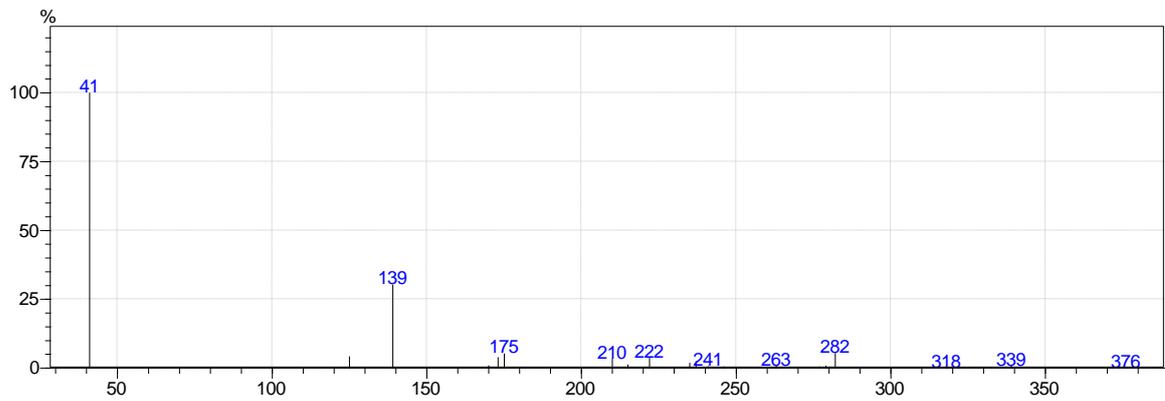
### Imazilil



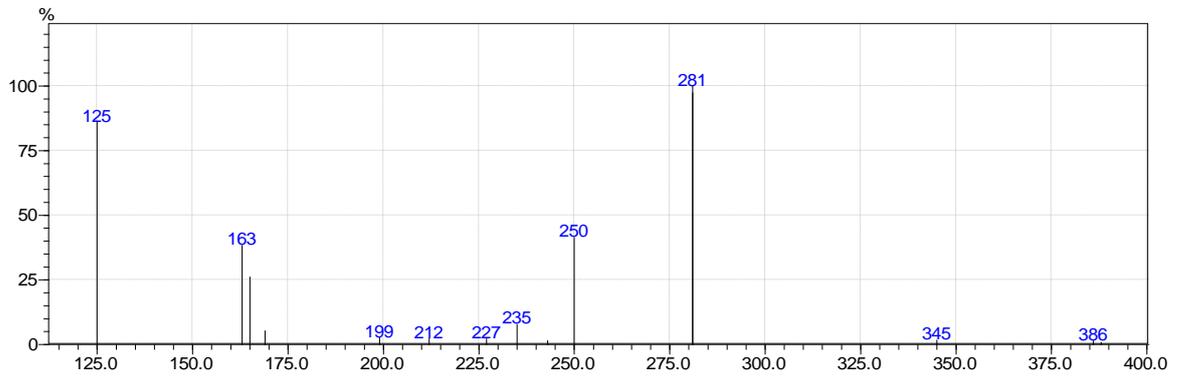
### Eton



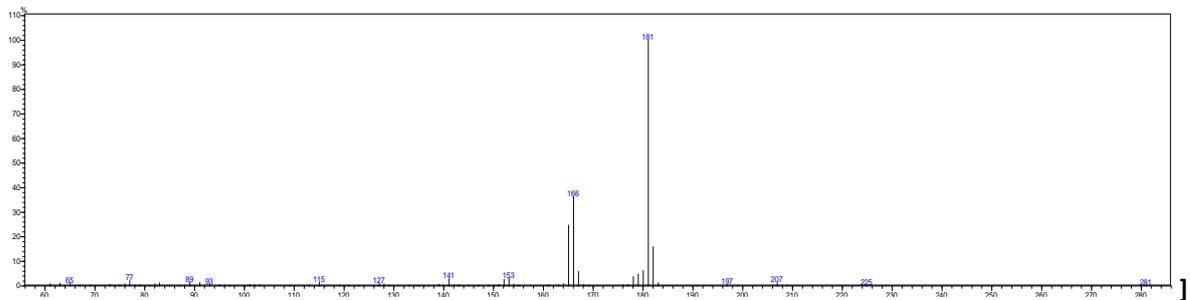
### Ciproconazol



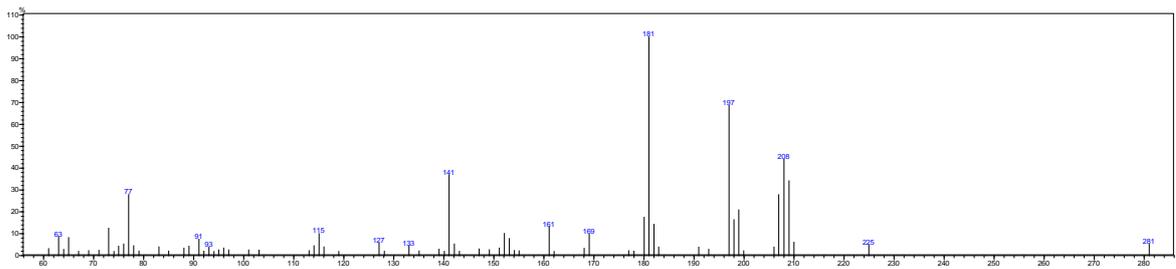
### Tebuconazol



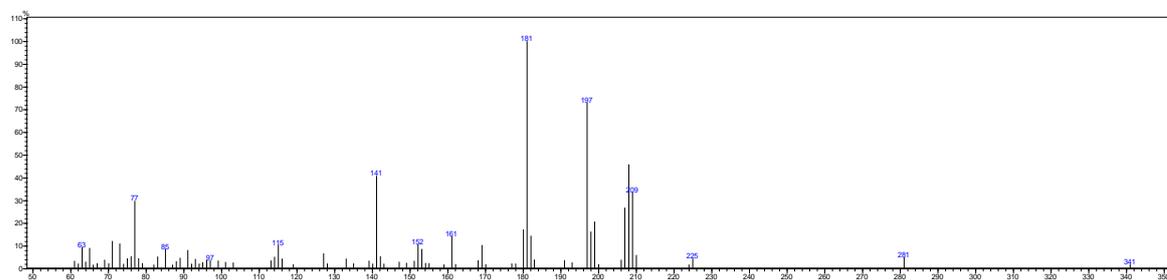
### Bifentrina



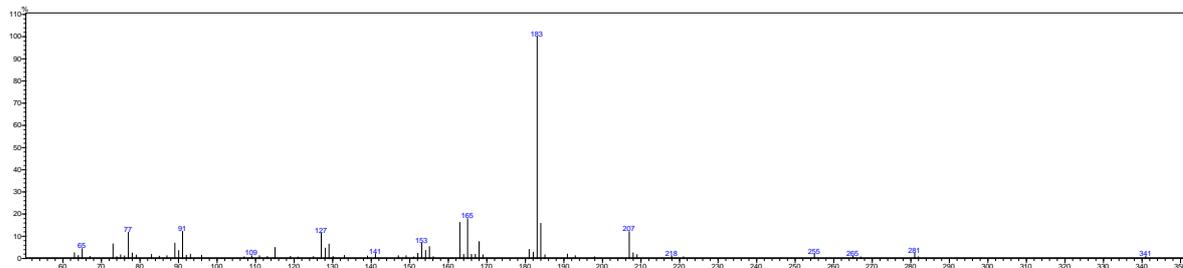
### L- Cialotrina I



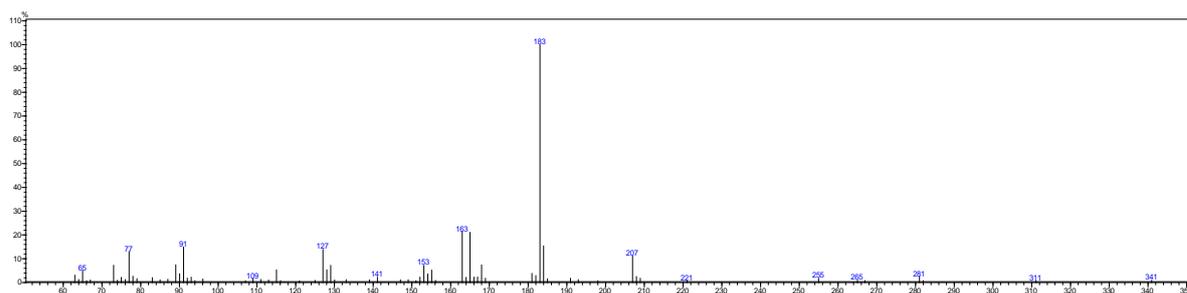
### L- Ciatrolina II



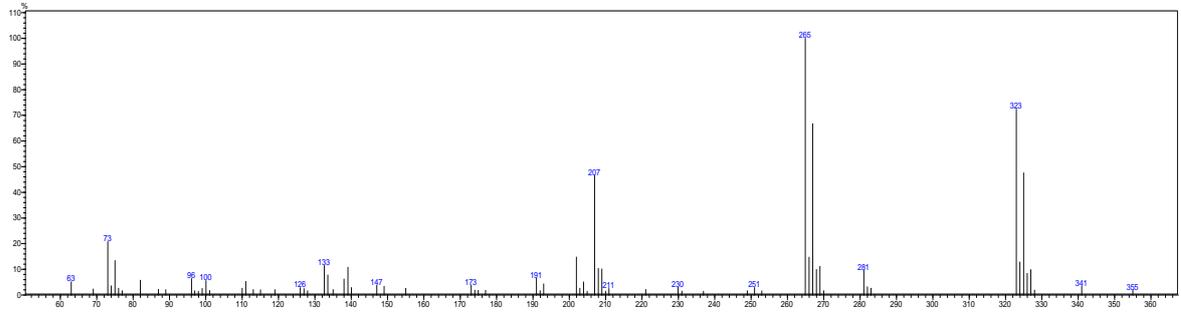
### Permetrina - I



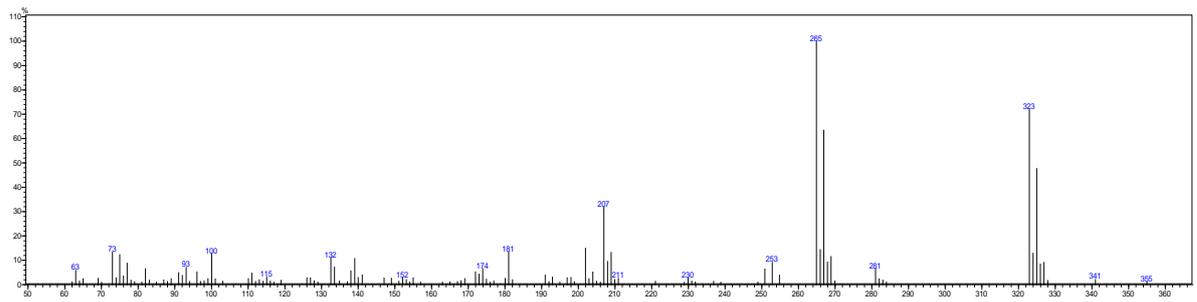
### Permetrina - II



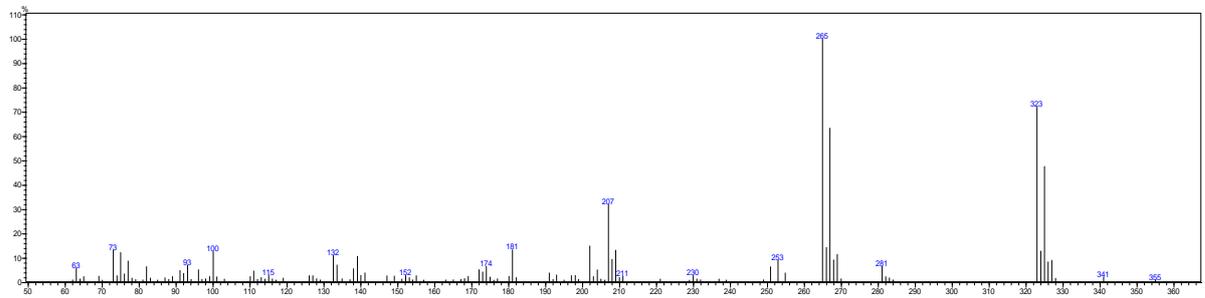
### Difeconazol I



### Difaconazol II



### Detalmetrina



# Azoxistrobina

