



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE
CAMPUS ANÍSIO TEIXEIRA**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

DENIS HARLEY NUNES LIMA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA
AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MINERAL EM AMOSTRAS
DE ALFACE (*Lactuca sativa* L.) DE DIFERENTES REGIÕES
DA BAHIA**

Vitória da Conquista, BA

2015

DENIS HARLEY NUNES LIMA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA
AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MINERAL EM AMOSTRAS
DE ALFACE (*Lactuca sativa* L.) DE DIFERENTES REGIÕES
DA BAHIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia, Universidade Federal da Bahia, como requisito
para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Santos Souza

Universidade Federal da Bahia – UFBA

Vitória da Conquista, BA

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

DENIS HARLEY NUNES LIMA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA
DETERMINAÇÃO DE CÁDMIO EM AMOSTRAS DE ALFACE
(*Lactuca sativa* L.) DE DIFERENTES CIDADES DA BAHIA**

Esta dissertação foi julgada adequada à obtenção do grau de Mestre em Biociências e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia. Vitória da Conquista – BA, 2015.

Prof. Dr. Anderson Santos Souza
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Douglas Gonçalves da Silva
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

Profa. Dra. Elenir Souza Santos
Universidade Federal da Bahia

Dedico a Deus pelo sustento e a meu pai (Leronido) e minha mãe (Raidalva) por um amor que não existem explicações.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser único, presente e eterno.

Aos meus pais por serem as melhores, maiores e mais amáveis pessoas deste mundo.

Ao meu irmão Aurélio, de sangue de alma e de espírito. Deus tem um plano grande para ti, pois te deu um coração aberto. Obrigado por sempre me apoiar.

À minha família por todo apoio que me deram.

A Mohammed por ser um amigo que me ajudou e incentivou em cada momento, sem medir esforços. "Brodi", valeu pelo companheirismo e amizade e hoje eu sei que definitivamente Deus não envia soldado algum sozinho para a batalha.

A Rafael, um amigo de faculdade e um amigo para a vida, que sempre nos apoiamos e incentivamos a crescer. Nesse caso, dois chatos se deram bem, rsrs.

Aos grandes amigos que tenho na vida (Jhon, Rafael, Cassya, Ricardo, Denisar, Geysa, Andressa). Foram muitos momentos de resenha, que com certeza irão se repetir muitas e muitas vezes.

À Ana Cláudia que chegou bem depois, mas parecia mais preocupada do que eu com o trabalho. Sem dúvidas, mais uma amizade.

Aos demais amigos e colegas de laboratório 114 (Ronei, Ítalo, Rafael França, Iasmim, Naiara, Jéssica, Dandara) bem como a galera dos troncos (lab 115) e o povo do lança perfume (Lab 109)

Ao professor Anderson, que além de orientador é um amigo e sua paciência permitiu que tudo acontecesse.

À UFBA, pelo incentivo, estrutura e conhecimentos cedidos.

À FAPESB pela bolsa concedida no período.

*“Confie no Senhor de todo o coração e não se apoie na sua
própria inteligência. Lembre-se de Deus em tudo o que
fizer, e Ele lhe mostrará o caminho certo.”*

(Provérbios 3:5-6)

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----------|
| Tabela 1: Valores máximos permitidos para o cádmio em alimentos de acordo com a ANVISA | 14 |
| Tabela 2: Alguns estudos utilizando a DLLME e o F AAS para determinação de metais | 21 |
| Tabela 3: Exemplo de um conjunto de dados de duas variáveis | 24 |
| Tabela 4: Níveis dos parâmetros variáveis para o planejamento fatorial de 2 níveis | 35 |
| Tabela 5: Matriz e resultado do Planejamento fatorial de 2 níveis..... | 36 |
| Tabela 6: Matriz de planejamento usando o desenho Box-Behnken para 3 variáveis | 38 |
| Tabela 7: Valores Críticos do método após a otimização usando o desenho Box-Behnken | 41 |
| Tabela 8: Pontos de corte para a análise de Robustez do método..... | 45 |
| Tabela 9: Matriz do planejamento fatorial de 2 níveis para o teste de Robustez | 46 |
| Tabela 10: Resultado da análise de interferentes para o cádmio | 48 |
| Tabela 11: Resultados para o teste de recuperação com adição de analito à amostra | 49 |
| Tabela 12: Resultado da aplicação do método proposto para as amostras de Alface proveniente das 15 cidades estudadas | 50 |
| Tabela 13: Resultados da composição mineral da alface para as amostras das cidades do estudo | 51 |
| Tabela 14: Variância acumulada | 52 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Distribuição de variedades de alface comercializadas pela CEAGESP, na cidade de São Paulo, entre os anos de 1990 e 2010, com valores expressos em porcentagem de aquisição. | 5 |
| Figura 2: Efeitos da contaminação de ambientes com metais pesados para plantas. Notar que em todos os processos há um transporte para os tecidos do vegetal. | 7 |
| Figura 3: Representação esquemática do transporte e ação do cádmio no organismo humano. Nota-se que o efeito nocivo no rim pode levar à uma não excreção do metal. | 12 |
| Figura 4: Representação esquemática da microextração utilizando solventes orgânicos. 1. Amostra com metal disperso (●); 2. Adição de um agente complexante (AC) (■); 3. Ligação de AC com metal (●■); 4. Adição de pequeno volume de solvente orgânico (□); 5. Separação das duas fases e pré-concentração do metal | 17 |
| Figura 5: Proporção de trabalhos publicados utilizando as principais técnicas de microextração em fase sólida no período de 2010 a 2012. DLLME = Dispersive Liquid-Liquid Microextraction; SDME = Single Drop Microextraction; HFME = Hollow-fiber-protected microextraction; LLME= Liquid-liquid microextraction. | 18 |
| Figura 6: Variações da SDME. A: extração direta (a gota em contato com a solução); B: extração em headspace (contato com compostos voláteis). | 19 |
| Figura 7: Representação da plotagem dos dados através da Análise de Componentes Principais. Cada bolinha representa uma linha na matriz dos dados e representa a interação entre a variável 1 e a variável 2. | 25 |
| Figura 8: Exemplo de gráficos de pesos e escores. No gráfico da esquerda, as variáveis (metais) foram plotadas e no gráfico da direita foram plotadas as amostras. Notar que há uma complementariedade de informações, de modo que só é possível entender um através da comparação com o outro. | 25 |
| Figura 9: Exemplo de um dendograma. | 26 |
| Figura 10: Estudo do efeito do aumento da concentração do agente complexante sobre a sensibilidade do método. | 34 |
| Figura 11: Efeito da variação do volume da gota do reagente extrator. | 35 |
| Figura 12: Gráfico de Pareto mostrando os efeitos das variáveis estudadas durante o Planejamento fatorial de 2 níveis. | 37 |

| | |
|---|----|
| Figura 13: Superfície de resposta Volume do extrator em função do pH | 37 |
| Figura 14: Superfície de resposta do efeito do pH em função da Concentração do complexante | 38 |
| Figura 15: Gráfico de Pareto dos efeitos usando o desenho de Box-Behnken | 39 |
| Figura 16: Superfície de resposta pH em função da concentração do complexante | 40 |
| Figura 17: Superfície de resposta do efeito do Volume do Extrator e a concentração do Complexante | 40 |
| Figura 18: Superfície de resposta do efeito do Volume do Extrator em função do pH. | 41 |
| Figura 19: Curva de Linearidade para o método proposto | 42 |
| Figura 20: Curva de Calibração Externa do cádmio | 44 |
| Figura 21: Gráfico de Pareto para o Teste de Robustez | 47 |
| Figura 22: Gráfico de pesos PC1 xPC2 | 53 |
| Figura 23: Gráfico de escores PC1 xPC2. | 53 |
| Figura 24: Gráfico de Pesos para PC1 x PC3 | 54 |
| Figura 25: Gráfico de escores para PC1 x PC3 | 54 |
| Figura 26: Gráfico de HCA que revela a distância entre as amostras de diferentes cidades estudadas | 55 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| Siglas | Nome por Extenso |
|---------------|---|
| 5-Br-PADAP | 2-(5-Bromo-2-piridilazo)-5-(dietilamino)fenol |
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| DLLME | Dispersive Liquid-Liquid microextraction |
| F AAS | Espectrometria de absorção atômica com chama |
| FE | Fator de Enriquecimento |
| HCA | Análise de Agrupamento Hierárquico |
| IBGE | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística |
| LD | Limite de Detecção |
| LQ | Limite de Quantificação |
| MERCOSUL | Mercado Comum do Sul |
| PCA | Análise de Componentes Principais |
| RSD | Desvio Padrão Relativo |
| SDME | Microextração por gota única |

RESUMO

A quantificação de metais tóxicos é uma área que envolve um grande número de trabalhos voltados à pré-concentração e extração dessas espécies, tendo em vista que, na maioria das vezes, se encontram em baixos teores, e mesmo assim desempenham toxicidade. O desenvolvimento, otimização e certificação de métodos analíticos para extração e quantificação de metais por meio da técnica DLLME (microextração líquido-líquido por gota dispersiva) tem se mostrado uma alternativa bastante viável, principalmente levando em consideração o grande número de trabalhos publicados recentemente, além de estes possuírem alta sensibilidade e eficiência na extração. O cádmio, como metal tóxico se destaca por possuir toxicidade mesmo em baixas concentrações. Em tecidos vegetais e animais, é bastante relacionado com processos de bioacumulação, o que aumenta inúmeras vezes a preocupação com serviços de controle de qualidade na produção. Nesse sentido, este trabalho teve o objetivo de desenvolver um método analítico para a determinação de cádmio em amostras de alface cultivadas em diferentes cidades da Bahia. Pelos resultados obtidos, o método foi otimizado controlando-se o pH em uma faixa de 10,5 a 11,0, e utilizando uma mistura composta de 0,36 μL de extrator (1-octanol) e 800 μL de um agente dispersor (etanol). O método apresentou baixos limites de detecção e quantificação (LD 0,610 $\mu\text{g/L}$ e LQ 2,032 $\mu\text{g/L}$). Este também se mostrou linear e preciso, além de robusto. Pela aplicação da metodologia, não foram encontradas quantidades significativas de cádmio nas amostras de alface coletadas, não sendo representativo de contaminação toxicológica, quando comparada à legislação brasileira (Resolução ANVISA, RDC nº 42, de 30/08/2013) . Às análises exploratórias realizadas (PCA e HCA) revelaram que não houveram grandes diferenças significativas de composição dos minerais estudados entre as amostras das cidades, uma vez que mesmo localidades distintas se agruparam. Portanto, a técnica se mostrou eficaz para a extração e quantificação do cádmio, e se mostra como alternativa principalmente por estar dentro dos princípios da química verde, que pregam a utilização de uma menor quantidade de reagentes em análises químicas.

PALAVRAS-CHAVE: Desenvolvimento de método; Cádmio; DLLME; Alface.

ABSTRACT

The quantification of heavy metals is an area that involves a large number of studies directed to preconcentration and extraction these species, since they most often are found in low amounts, but causes toxicity. The development, optimization and certification of analytical methods for extraction and quantification of metals with DLLME technique (dispersive liquid-liquid microextraction) has proven to be a very viable alternative, in aims to the number of papers published recently, besides having high sensitivity and efficiency in extraction. Cadmium, as a heavy metal, stands out for having toxicity even at low concentrations. In plant and animal tissues, it is closely related to bioaccumulation processes, which increases many times concern for quality control of services in production. Therefore, this study aimed to develop an analytical method for the determination of cadmium in samples of lettuce grown in different cities of Bahia. From the results obtained, the method was optimized by controlling the pH at 10.88, and using a mixture composed of 0.36 uL extractor (1-octanol) and 800 uL of a dispersing agent (ethanol). The method showed low limits of detection and quantification (LD 0.610 mg / L and LQ 2.032 mg / L). This was also linear, accurate, and robust. Applying the methodology, there were no significant amounts of cadmium in collected samples of lettuce, not being representative of toxicological contamination compared to Brazilian law. The exploratory analyzes (PCA and HCA) revealed that there were no significant differences in large mineral composition of the samples studied between cities, since even different locations gathered. Therefore, the technique proved effective for extraction and quantification of cadmium, and shows mainly alternatively be within the principles of green chemistry, nail that the use of a lower amount of reagents in chemical analysis.

KEYWORDS: Development method; cadmium; DLLME; Lettuce.

Sumário

| | |
|--|----|
| Introdução | 1 |
| 1. Revisão da Literatura | 3 |
| 1.1 Caracterização do Objeto de Estudo: A alface | 3 |
| 1.1.1 Características da composição química da alface | 5 |
| 1.1.2 Processos de bioacumulação de metais tóxicos em vegetais | 7 |
| 1.2 O metal cádmio | 10 |
| 2.1 Toxicidade do cádmio | 11 |
| 1.2.2 Níveis máximos de cádmio permitidos em alimentos | 13 |
| 1.3 Técnicas de pré-concentração: A Microextração em Fase Líquida | 16 |
| 1.3.1 Microextração por gota única (SDME) | 18 |
| 1.3.2 Microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME) | 20 |
| 1.3.2.1 Utilização da DLLME acoplada à espectrometria de absorção atômica com chamas (F AAS) | 21 |
| 1.5 Reconhecimento de Padrões: Análises exploratórias de dados | 22 |
| 1.5.1 Análise de Componentes Principais (PCA) | 23 |
| 2. Justificativa | 27 |
| 3. Objetivos: | 28 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL: | 28 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS: | 28 |
| 4. Materiais e métodos | 29 |
| 4.1. Equipamentos utilizados | 29 |
| 4.2. Preparo das soluções | 29 |
| 4.2.1 Soluções de referência / trabalho IUPAC de metais | 29 |
| 4.2.3 Solução estoque de 5-Br-PADAP 0,01% (m/v) | 29 |
| 4.2.4 Soluções de ácido nítrico e clorídrico à 0,5 mol L ⁻¹ | 30 |
| 4.2.5 Soluções-tampão utilizadas..... | 30 |
| 4.2.5.1 Tampão bicarbonato / Hidróxido de sódio (pH 10,88) | 30 |
| 4.2.5.2 Tampão bicarbonato / Hidróxido de sódio (pH 11,00) | 30 |
| 4.2.5.3 Tampão fosfato monobásico de sódio / fosfato bibásico de sódio (pH 7,00)..... | 31 |
| 4.2.5.4 Tampão Borato / Ácido bórico (pH 9,00) | 31 |
| 4.3. Coleta das Amostras..... | 31 |
| 4.4 Preparo das amostras..... | 32 |
| 4.5 Digestão das amostras | 32 |

| | |
|--|-----------|
| 4.6 Sistema de pré-concentração proposto para o cádmio..... | 32 |
| 4.7 Determinação de Cu, Mg, Ca, Fe e Zn | 33 |
| 5. RESULTADOS | 34 |
| 5.1. Desenvolvimento do método para a determinação de cádmio | 34 |
| 5.1.1. Pré-etapa do desenvolvimento do método: Planejamento Univariado | 34 |
| 5.1.2 Planejamento fatorial de 2 níveis..... | 35 |
| 5.1.3 Otimização do método usando o desenho Box-Behnken..... | 38 |
| 5.1.4 Figuras de Mérito para o método desenvolvido | 42 |
| 5.1.4.1 Curva de Linearidade..... | 42 |
| 5.1.4.2 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) | 43 |
| 5.1.4.3 Fator de Enriquecimento (FE) | 43 |
| 5.1.4.4 Precisão (RSD) | 44 |
| 5.1.4.5 Robustez..... | 45 |
| 5.1.4.6 Análise de Interferentes..... | 47 |
| 5.1.4.7 Teste de Recuperação | 48 |
| 5.1.5 Aplicação do método..... | 49 |
| 5.2 Determinação direta de macrolelementos em alface | 50 |
| 5.2.1 Análise de Componentes Principais (PCA) | 52 |
| 5.2.2 Análise de agrupamento hierárquico (HCA)..... | 54 |
| 6. Discussão..... | 56 |
| 6.1 Desenvolvimento do método..... | 56 |
| 6.1.1 Etapa prévia ao desenvolvimento do método: Planejamento Univariado | 56 |
| 6.1.2 Estudo do efeito do volume dos solventes extrator e dispersor | 56 |
| 6.1.3 Estudo do efeito do pH..... | 57 |
| 6.2 Parâmetros de certificação do método..... | 58 |
| 6.3 Aplicação do método | 61 |
| 6.4 Análise exploratória dos dados | 62 |
| 6.4.1 Análise de componentes principais (PCA)..... | 62 |
| 6.4.2 Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA)..... | 63 |
| 7. Conclusão | 64 |
| 8. Referências | 65 |

Introdução

A quantificação de espécies químicas é de suma importância para se conhecer meios e ambientes que envolva a vida. Em se tratando de alimentos, é fundamental que estudos sejam feitos cada vez mais com variedades alimentares, sejam nas formas “*in natura*” ou não. O objetivo é garantir que o conhecimento sobre suas características nutricionais e/ou toxicológicas esteja acessível, atualizado e que abranja o maior número alimentos e de locais onde são produzidos, uma vez que características como solo, clima, temperatura e controle de qualidade podem influenciar no produto final (SKOOG, 2006; REIS, MIRANDA e BACCAN, 1996).

Espécies que podem causar agravos devido à sua toxicidade são em geral uma grande preocupação hoje em dia. Na maioria das vezes, esses teores causam danos mesmo em concentrações extremamente baixas, como é o caso dos metais pesados. O cádmio, como um elemento pertencente a esse grupo, deve ser estudado, tendo em vista que concentrações muito baixas (da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$) causam efeitos tóxicos e tendem a se acumular em tecidos vivos, seja de plantas ou animais. O desenvolvimento e atualização de métodos para a determinação desses metais é uma grande área de estudo em trabalhos químicos (TOPPI e GABRIELLI, 1998).

A pré-concentração é uma boa alternativa para a determinação de metais quando se trata de espécies com baixo teor em determinada amostra e quando possuímos uma técnica analítica de baixa sensibilidade. Essas técnicas, como é o caso do F AAS (Espectrometria de absorção atômica com chama), são mais comuns em laboratórios de química e centros de pesquisa, principalmente devido ao seu valor e custo de manutenção relativamente baixos (quando comparada a técnicas mais sensíveis, como, por exemplo a Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado – ICP-OES) (REIS, MIRANDA e BACCAN, 1996).

Várias técnicas de pré-concentração vêm sendo desenvolvidas e cada vez mais se busca incorporar os princípios da química verde na sua execução, ou seja, diminuir cada vez mais a utilização de reagentes químicos (principalmente orgânicos). Dessa maneira, a microextração líquido-líquido por gota dispersiva (DLLME) se torna uma boa opção, uma vez que a quantidade utilizada pelo princípio é baixa (do tamanho de uma gota). Embora sua execução requer um grande

treinamento por parte dos executores, estudos demonstram que a técnica possui uma grande sensibilidade e uma boa reprodutibilidade (KOCÚROVÁ *et al*, 2013).

1. Revisão da Literatura

1.1 Caracterização do Objeto de Estudo: A alface

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma planta que pertence à família Asteraceae, que também inclui grande parte de flores como o crisântemo, da ordem Asterales e da classe Magnoliatae. Sua estrutura se baseia em um caule pequeno onde se sustentam as folhas, que podem adquirir diferentes tonalidades de verde claro ao escuro, além de cores exóticas como o roxo. A coloração roxa se dá principalmente pela presença de antocianinas em suas folhas. Em sua fase reprodutiva, é caracterizada pela projeção de pequenas flores amareladas em uma haste que nasce do caule (MAGALHÃES, 2006). A alface é um dos alimentos que possui uma larga utilização em várias culturas do mundo, sendo consumida principalmente na sua forma crua, *in natura*, em saladas e outras preparações (SALA & COSTA, 2012).

A história da alface é controversa mas data-se de cerca de 2500 a.C. principalmente cultivada no Egito Antigo. Achados arqueológicos de imagens e pinturas apontam para a utilização da hortaliça tanto na alimentação quanto em oferendas, o que representa sua importância em rituais religiosos. Do Egito, ela foi espalhada pelo mundo principalmente pelos gregos e a expansão do Império Romano. Na China, sua popularização data-se apenas em cerca de 400 a 600 anos d.C. Chegou ao continente americano por volta de 1494, principalmente em decorrência das viagens de Cristóvão Colombo, que traziam, entre outros produtos, diversos tipos de alimentos oriundos da cultura europeia (VRIES, 1997).

A depender do formato das folhas, caule e variedade da planta, podem ser classificadas em lisa, crespa, americana, mimosa e romana, além da classificação em tonalidade verde ou roxa. De uma forma sistemática, os tipos produzidos no Brasil são: Repolhuda Lisa, Repolhuda Crespa ou Americana, Solta Lisa, Solta Crespa, Solta Crespa Roxa e Tipo Romana, sendo que destes os mais conhecidos e consumidos as crespas e as lisas, que foram melhoradas geneticamente para se adaptarem ao clima tropical brasileiro. Contudo, diversas variedades também ganharam espaço no mercado brasileiro como as variedades americana e de folhas

roxas, sobretudo pela capacidade de variar a combinação em preparações culinárias. (HENZ e SUINAGA, 2009).

Do ponto de vista econômico, a alface é a hortaliça de maior valor comercial no Brasil, pois sua utilização se estende à todas as regiões do país (CECILIO FILHO e MAY, 2002). Como consequência desse grande consumo, quase sempre é integrante das chamadas hortas domésticas, sobretudo quando se trata de famílias que dependem de agricultura familiar. Por ser altamente perecível, a hortaliça em geral é cultivada em regiões próximas das cidades, formando os “cinturões verdes” de produção. A alface lisa parece ser a que melhor se adaptou ao território brasileiro, mas há a produção e o consumo de diversas variedades da planta (HENZ e SUINAGA, 2009).

Outro fator bastante interessante é a possibilidade da realização de uma cultura de alface juntamente com outras hortaliças sem que haja prejuízo na produtividade. Em um estudo conduzido por Silva *et al* (2008), avaliou-se a viabilidade econômica da cultura concomitante entre alface e pepino japonês (cultivo em consórcio) e demonstrou que além de reduzir os custos operacionais da produção, o consórcio apresentou lucro operacional significativo, indicando a viabilidade do sistema (SILVA *et al*, 2008). Isso se torna importante para a agricultura familiar, uma vez que abre possibilidades para cultivo de outras hortaliças, diversificando os alimentos gerados, que serão utilizados para a geração de renda e para a própria subsistência das famílias.

A Figura 1 mostra a distribuição da comercialização de algumas variedades de alface em um dos grandes centros econômicos do país, a cidade de São Paulo, no estudo realizado por Sala e Costa (2012). A população descrita no estudo aparenta ter uma vasta preferência sobre as variedades da planta, mesmo que os resultados não revelem a totalidade de variedades cultivadas no Brasil.

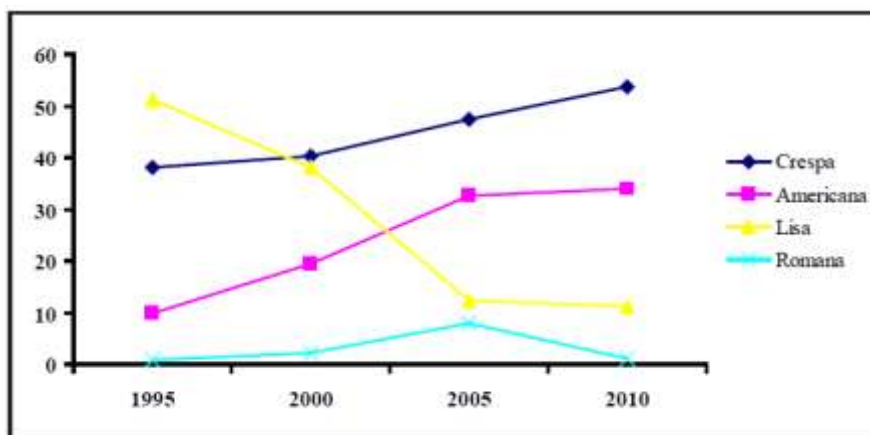


Figura 1: Distribuição de variedades de alface comercializadas pela CEAGESP, na cidade de São Paulo, entre os anos de 1990 e 2010, com valores expressos em porcentagem de aquisição.

Fonte: (SALA e COSTA, 2012).

Dados do IBGE apontam para uma produção nacional de aproximadamente 525 mil toneladas em 2006, movimentando um mercado de mais de 440 milhões de reais. Na Bahia, foram produzidas quase 10 mil toneladas naquele ano (movimentação de quase 14 milhões de reais). Interconectada à essa produção, está o cultivo das demais hortaliças, que incluem abobrinha, acelga, alface, beterraba, cenoura, chuchu, tomate e vários outros (IBGE, 2006).

1.1.1 Características da composição química da alface

A alface, assim como todas as hortaliças folhosas são itens essenciais e aconselhados nos cardápios da dieta habitual de um indivíduo. Do ponto de vista nutricional, suas características ligadas à quantidade de seus nutrientes, como fibras, vitaminas e minerais explicam o porquê de sua enorme recomendação. De uma forma geral, esses nutrientes contribuem para o bom funcionamento do sistema digestivo, além de participar de diversos processos fisiológicos, que incluem produção de energia, processos enzimáticos e de eliminação de resíduos (WAITZBERG, 2009; SILVA e MURA, 2007; GUYTON, 1998).

O Guia Alimentar para a População Brasileira recomenda o consumo de 6 porções de frutas, verduras e legumes diariamente, como forma de manter um bom

aporte nutricional (BRASIL, 2008). Já para Phillip *et al* (1999) o consumo de hortaliças deve ser de 4 porções por dia (compreendendo verduras e legumes) sendo o máximo de 6 porções por dia. Dessa forma, fica evidente a importância desses alimentos na alimentação humana e que este consumo seja diário.

A Tabela Brasileira de Composição de Alimentos, traz informações a respeito da composição química da alface utilizada pelos serviços de nutrição como base para prescrição do alimento. Por ela, percebemos que diversos minerais estão presentes em sua composição, como é o caso do cobre (0,02 mg/100g de alimento cru), zinco (0,2 mg/100g de alimento cru), sódio (7 mg/100g de alimento cru), magnésio (6 mg/100g de alimento cru), cálcio (14 mg/100g de alimento cru), fósforo (19 mg/100g de alimento cru) e potássio (136 mg/100g de alimento cru). Teores de carboidratos, proteínas e lipídeos também é descrito, apresentando valores na ordem de, respectivamente, 1,7, 1,3 e 0,2 g/100g de alimento cru (UNICAMP, 2011). Proporções parecidas de concentração de metais também são descritas por Kawashima e Soares (2003).

Em sistemas hidropônicos de produção da hortaliça (em que as plantas são imersas e cultivadas em uma solução contendo nutrientes e não em um solo) valores parecidos de concentração de carboidratos (1,8g/100g de alimento cru), proteínas (1,3 g/100g de alimento cru) e lipídeos (0,2 g/100g de alimento cru) foram descritos por Ohse *et al* (2001). No estudo não foram determinadas concentrações de minerais, apenas o resíduo mineral (média de 0,8 g/100g de alimento cru).

Quando o solo apresenta valores diferenciados de metais presentes em sua composição, a concentração na planta parece ficar prejudicada. Para Pinto *et al* (2014) a alface mostrou um aumento nas concentrações de alguns metais, em especial o Fe, Al, V, Cr e Pb, quando plantadas em solo com adição desses elementos, concluindo que o valor nutricional final está muito relacionado com o solo e as condições ambientais em que elas são produzidas (PINTO, 2014). A mesma tendência é observada quando foram cultivadas em solo tratado com lixo urbano, em que o produto final apresentava altas concentrações de Pb e Cu, indicando que a alface é extremamente sensível ao solo onde é produzida (SANTOS, 1998).

1.1.2 Processos de bioacumulação de metais tóxicos em vegetais

Sabe-se que o cádmio, assim como outros metais pesados podem se acumular em tecidos de estruturas vegetais. O processo de acumulação pode ser entendido como um mecanismo de defesa da planta, que “sequestra” o metal e “armazena” em tecidos não ativos. São vários os mecanismos de sequestro e compartimentalização a nível celular que incluem mobilização na parede celular e interação com metaloproteínas. Todo esse arranjo de mecanismos e vias bioquímicas tendem a influir na tolerância dos vegetais aos teores de cádmio (TOPPI e GABRIELLI, 1999).

Em termos bioquímicos, a acumulação de metais pesados é realizada através de proteínas (metaloproteínas) que os transportam para os tecidos. Como na maioria das vezes essa não é uma função própria dessas proteínas, um processo de stress oxidativo se instala na célula, lesando-a. Contudo, algumas células podem desenvolver mecanismos de antioxidantes, o que reduziriam os danos das espécies oxidativas (espécies reativas de oxigênio), podendo ser utilizadas em processos de fitorremediação. A Figura 2 mostra os efeitos possíveis quando vegetais são cultivados em ambientes contaminados (PERALTA-VIDEA et al, 2009).

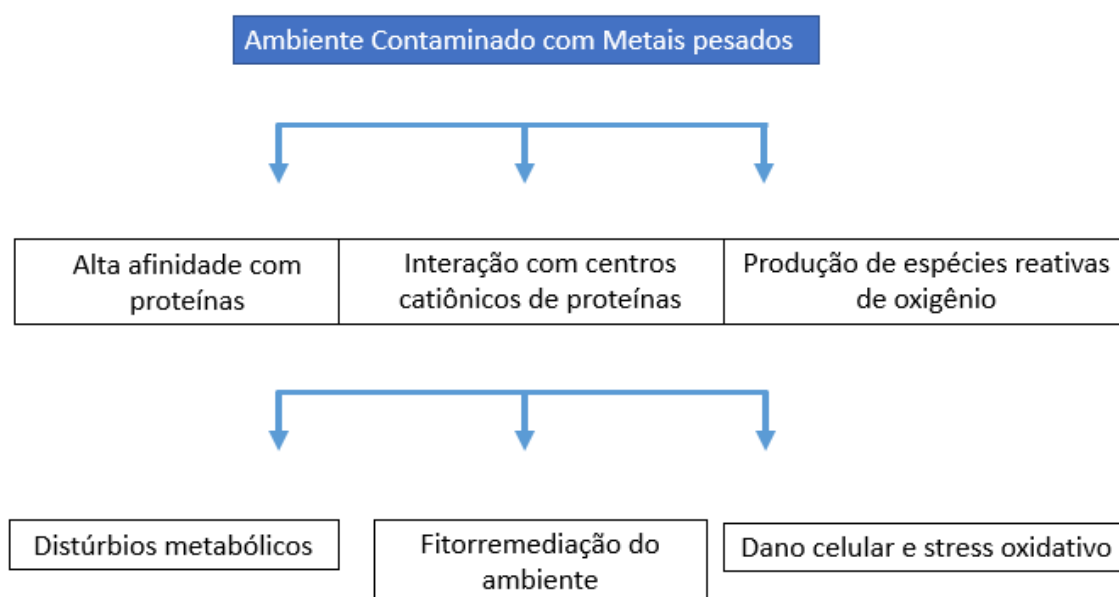


Figura 2: Efeitos da contaminação de ambientes com metais pesados para plantas. Notar que em todos os processos há um transporte para os tecidos do vegetal.

Fonte: PERALTA-VIDEA et al, 2009.

Em um estudo conduzido por Zorrig *et al* (2010) a acumulação de cádmio e citrato foi analisada em alface durante 14 dias. O crescimento das plantas foi controlado e suplementado com os nutrientes necessários e com a adição do cádmio como poluente. Ao final do experimento, observou-se que as três variedades estudadas apresentavam tendências para acumulação do metal, tanto nas raízes quanto nas folhas. Além disso, foi observado três tendências principais nas vias de acumulação do cádmio: em primeiro lugar o fato de haver acumulação não reduzia o peso seco das plantas, ou seja, elas tenderiam a manter sua forma intacta e sem aparentar alterações visuais e de textura; segundo, houve um aumento de zinco nos tecidos onde o cádmio era depositado, sugerindo que os dois metais podem possuir as mesmas vias de transporte na planta, o que explicaria a alta correlação positiva entre os dois metais; por último, se observou um acúmulo de citrato nas regiões onde o cádmio estava mais presente, principalmente na parte aérea da planta, indicando a possibilidade do transporte do metal ser conduzido pelo citrato.

A relação de transporte entre zinco e cádmio também foi descrita em outras plantas. Laporte *et al* (2014) identificou a correlação de acumulação de cádmio e zinco em espécies de girassol, que novamente não apresentavam grandes modificações morfológicas nos tecidos.

Em algumas espécies de plantas nativas de regiões de pântanos da China, a correlação positiva entre a acumulação de cádmio, cobre e zinco também foi observada mas, nesse caso, a depender do grau de toxicidade do meio (concentração de metal na água de irrigação, por exemplo), do pH e da concentração de outros metais, essa correlação poderia ser diferenciada, ora maior, ora menor. O estudo ainda sugere a possibilidade da utilização dessas plantas como fitorremediadoras (DENG *et al*, 2004).

A alface é uma planta utilizada como modelo para se identificar bioacumulação de metais, principalmente pelo transporte facilitado ao redor de todos os tecidos. A mistura de contaminantes (tipos e quantidades de metais tóxicos no solo) é o que influenciará na qualidade nutricional final do produto (LIU *et al*, 2014).

A transferência do cádmio em uma cadeia alimentar foi avaliada por Li *et al* (2015), os autores perceberam que após o cultivo de alface em solo contaminado com o metal que posteriormente foi servida como alimento para caracóis. Eles observaram que o elemento era transferido ao longo da cadeia alimentar, sendo

depositado principalmente nas vísceras do animal. A relação solo-planta-caracol mostrou uma alternativa viável para se entender a magnitude da toxicidade do cádmio, uma vez que plantas e animais (que se alimentaram de plantas contaminadas) podem entrar na cadeia alimentar de outros seres vivos (LI *et al*, 2015).

Silva *et al* (2015) avaliaram a biodisponibilidade de alguns metais (cádmio, ferro e zinco) em amostras de alface quando submetidas à um modelo simulado *in vitro* de uma digestão gastrointestinal. O resultado mostrou que o cádmio foi o elemento mais biodisponível em valores que chegavam à 41% do teor total do elemento no alimento, indicando que este poderia ser mais facilmente absorvido (SILVA *et al*, 2015).

Sbartai *et al* (2012) observaram que quando tomateiros foram submetidos à um regime de suplementação de Cd e Zn por sete dias havia a variação da acumulação dos metais, que em geral, foi mais gradativa em raízes do que nas folhas (os resultados demonstraram acumulação em todos os compartimentos). Porém, quando a concentração do zinco é menor a acumulação do Cd parece não ser alterada, sendo proporcional em raízes e folhas. Mas quando estão em concentrações equivalentes, a concentração nas raízes tende a diminuir e aumentar nas folhas, indicando uma maior velocidade no transporte dos dois metais para as folhas. Outro fato interessante é que a dosagem de clorofila tende a diminuir na presença dos dois metais, além do Cd induzir a produção de enzimas como catalase, glutathione S-transferase e ascorbato peroxidase (SBARTAI *et al*, 2012).

Por fim, a acumulação de Cd também já foi estudada em sementes que também são consumidas como alimentos. Quando estudado o potencial de bioacumulação na soja, os resultados de concentração em raízes e folhas se mantiveram como os encontrados em outras plantas, contudo, a semente pareceu não receber uma grande quantidade do metal quando comparada com as folhas, mas mesmo assim se mantinha com valores superiores ao recomendado pelo *Codex Alimentarius* (comissão internacional que trata de diretrizes para a produção de diversos alimentos em todo o mundo), podendo ser até 4 vezes maior que o limite de 0,2 mg/kg de cádmio na semente. O que chamou mais a atenção do estudo foi o fato do solo ser contaminado com uma dose bem abaixo do índice máximo permitido

para o solo, de 1 mg/Kg, indicando que o processo de acumulação tende a ser contínuo e irreversível (SHUTE e MACFIE, 2006).

1.2 O metal cádmio

O cádmio (Cd) é um metal de transição. Suas características químicas incluem: número atômico 48, massa atômica 112,40 u, estado de oxidação 2^+ , ponto de fusão $320,9\text{ }^{\circ}\text{C}$, ponto de ebulição $765\text{ }^{\circ}\text{C}$ e densidade de $8,65\text{ g/mL}$. Possui uma proximidade química com o zinco, pois ambos pertencem à mesma família 2B, e isso influencia em diversos processos naturais de vias de transporte, como já mostrados nos tópicos anteriores. Ocorre naturalmente na natureza na forma de minérios de sulfeto e quando está aumentada sua concentração no solo, ar, água e alimentos, é um indicativo de grande atividade industrial (ADRIANO, 2001).

Esse metal é componente de ligas anticorrosivas como o aço, além de fazer parte de pigmentos e plásticos usados em diversos utensílios e instrumentos na vida do ser humano. Também é componente bastante utilizado em pilhas e baterias, circuitos eletrônicos e reatores nucleares. Contudo, vários países têm limitado ou até mesmo proibido através de leis específicas a utilização/presença do metal nesses componentes, na tentativa de conter a exposição à sua toxicidade (NORBERG *et al*, 2007).

Assim como chumbo (Pb), níquel (Ni), mercúrio (Hg) e zinco (Zn), o cádmio pode ser classificado como metal pesado ou tóxico por possuírem características químicas parecidas. Conceituar o termo “metal pesado” é atualmente uma discussão entre vários campos da ciência, em especial a química e a toxicologia, que levam conceitos para diversas áreas do conhecimento, como ciências biológicas, da saúde e ambientais (LIMA e MERÇON, 2011).

De uma forma geral, metal pesado é definido ao possuir as seguintes características: pela densidade, que pode variar o valor unitário de autor para autor, ficando entre $3,5$ a 7 g/cm^3 ; peso atômico, para metais com peso atômico elevado, (como o mercúrio, arsênio, cromo e cádmio); número atômico, em geral metais com número atômico compreendidos entre 21 (escândio) e 92 (titânio); toxicidade, elementos usados na indústria que podem desenvolver processos tóxicos à plantas e animais (DUFFUS, 2002).

O potencial tóxico dos metais pesados vai depender de sua localização e concentração no organismo, sendo que o Cd, Pb, Ni e Hg estão mais relacionados com a toxicidade em humanos. A avaliação de seus teores em solo, água, ar e alimentos tem ganhado destaque nos últimos anos, devido à incorporação desses metais na cadeia alimentar dos humanos (DUARTE, et al, 2000).

2.1 Toxicidade do cádmio

Sabe-se que o processo de bioacumulação do Cd em humanos é influenciado por vários fatores, como o ambiente contaminado (ar, solo, água), fatores relacionados à planta (tecido de deposição, susceptibilidade à acumulação, variedade botânica), interação do cádmio com moléculas orgânicas complexantes e a quantidade e intensidade da exposição. De uma forma geral, a principal via de exposição é através do consumo de plantas contaminadas, mesmo em concentrações consideradas baixas quando comparadas com outros elementos ($0,12 \text{ mg Kg}^{-1}$). Dessa forma, o controle das atividades agrícolas ganha grande importância para a redução do potencial de desenvolvimento da exposição (ADRIANO, 2001).

Quando se fala em exposição e toxicidade se faz necessário entender a forma como o elemento é absorvido e interage com o organismo. De uma forma geral a absorção do Cd é baixa quando comparada com outros elementos (cerca de 5 – 10% do cádmio ingerido é absorvido por humanos), mas a grande importância dos estudos em demonstrar seus níveis reside no fato deste poder se acumular em tecidos por décadas (10-30 anos). A acumulação tende a ocorrer em diversos tecidos, porém é nas células hepáticas onde tem sido descrito o maior potencial bioacumulador (NORDBERG *et al*, 2007).

Após ser absorvido na mucosa intestinal, o cádmio é transportado pelo plasma sanguíneo através de metaloproteínas – proteínas com capacidade de se ligar à metais, principalmente com a função de transporte. O destino final é a célula do corpo (mais precisamente células hepáticas, musculares e dos rins), onde pode produzir seu efeito danoso, como a indução da apoptose celular ou mutações gênicas. A Figura 3 mostra a relação de transporte e efeito nocivo entre o cádmio e as células do corpo, em especial o fígado e o rim. Percebe-se que um dos efeitos

tóxicos resulta justamente do processo de excreção renal que pode aumentar o acúmulo de cádmio e levar à doenças, como a insuficiência renal crônica (NORDBERG, 2007).

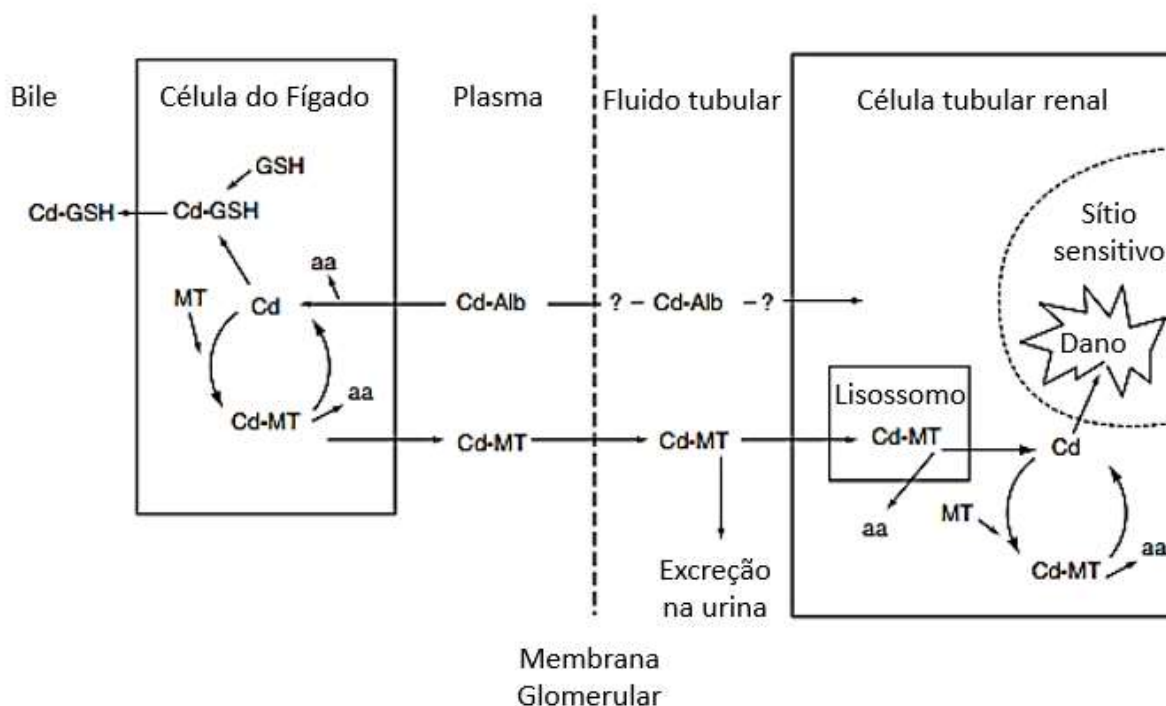


Figura 3: Representação esquemática do transporte e ação do cádmio no organismo humano. Nota-se que o efeito nocivo no rim pode levar à uma não excreção do metal.

Legenda: GSH: glutationa, MT: metaloproteína, aa: aminoácidos, Alb: albumina

Fonte: Adaptado de NORDBERG, 2007.

Chang e colaboradores (2013) avaliaram a interação entre cádmio e os mecanismos indutores de hepatotoxicidade e observaram que sua associação com substâncias presentes em inseticidas organofosforados aumenta o transporte do complexo para o interior das células, potencializando o estresse oxidativo, o que pode levar, entre outros efeitos, à morte celular (CHANG *et al*, 2013).

Outra linha de pensamento para a ação nociva do cádmio no corpo humano está em induzir modificações epigenéticas nas células. Epigenética pode ser entendida como modificações hereditárias mitóticas ou meióticas de expressão gênica que não estão associados à sequência do gene no DNA. Em outras palavras são modificações que irão alterar a expressão daquele gene sem que este sofra

mutação no código genético. Muitas dessas modificações estão sendo associadas ao aparecimento de cânceres e outras doenças em humanos (CHUANG e JONES, 2007).

Nesse sentido uma modificação epigenética poderia ser hereditária, contribuindo para o aparecimento de células mutantes no próprio indivíduo ou até mesmo transferir as modificações para próximas gerações. A associação da toxicidade do Cd com o aparecimento de células cancerosas é alta, indicando um grande risco potencial à saúde (WAALKES, 2003; SON *et al*, 2012). O risco de má formação e alterações no desenvolvimento do corpo de crianças também estão sendo associadas à toxicidade ao Cd, com exposições ainda na fase pré-natal, na forma de contaminação para mães e bebês (VILAHUR *et al*, 2015).

O Cd também pode induzir a destruição da estrutura celular. Células do fígado que foram submetidas à um tratamento com soluções de CdCl₂ em intervalos de concentrações de 1 a 300 µg/mL indicaram que todo o esqueleto de actina da célula, responsável por sua estruturação e forma, havia sido destruído seja por desorganização do citoesqueleto ou por ativação de stress metabólico (GO *et al*, 2013).

Em suma, os efeitos tóxicos do Cd incluem modificações que variam desde o aumento do stress metabólico da célula a modificações genéticas, que podem ser transmitidas para outras gerações. Seu potencial de acumulação em tecidos também deve ser observado, principalmente em plantas, uma vez que as utilizamos na nossa dieta habitual.

1.2.2 Níveis máximos de cádmio permitidos em alimentos

Devido ao grau de toxicidade e ao grande risco de exposições, mesmo que em baixas quantidades como já discutido anteriormente, governos e órgãos de controle de alimentos redigem leis e resoluções com valores máximos de contaminantes inorgânicos, como o cádmio, para serem respeitados por seus produtores. Na maioria das vezes, a elaboração da legislação inclui não somente o país produtor, como também um comprador, conforme acordos comerciais. No Brasil, o órgão responsável por esse controle é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que através da Resolução RDC nº 42, de 29 de agosto de 2013

publicada no Diário Oficial da União no dia 30 de agosto de 2013, regulamenta os valores máximos de contaminantes inorgânicos (arsênio, cádmio, chumbo, estanho e mercúrio) para diversos tipos de alimentos que são comercializados no MERCOSUL. Os valores para o cádmio estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Valores máximos permitidos para o cádmio em alimentos de acordo com a ANVISA

| Alimento | Valor Max. permitido* |
|---|------------------------------|
| Mel | 0,10 |
| Pasta de cacau | 0,30 |
| Chocolates e produtos de cacau com menos de 40 % de cacau | 0,20 |
| Chocolates e produtos a base de cacau com mais de 40 % de cacau | 0,30 |
| Bebidas analcoólicas (excluídos os sucos) | 0,02 |
| Sucos e néctares de frutas | 0,05 |
| Bebidas alcoólicas fermentadas e fermento-destiladas, exceto vinho | 0,02 |
| Vinho | 0,01** |
| Cereais e produtos de e a base de cereais, excluídos trigo, arroz e seus produtos derivados e óleos | 0,10 |
| Trigo e seus derivados exceto óleo | 0,20 |
| Arroz e seus derivados exceto óleo | 0,40 |
| Soja em grãos | 0,20 |
| Hortaliças do gênero <i>Brassica</i> excluídas as de folhas soltas | 0,05 |
| Hortaliças de folha (incluídas as <i>Brassicaceae</i> de folhas soltas) e ervas aromáticas frescas | 0,20 |
| Hortaliças Frutos com folhas em bainha | 0,05 |
| Hortaliças Frutos da família <i>Cucurbitaceae</i> | 0,05 |
| Hortaliças de fruto, distintas da família <i>Curcubitácea</i> | 0,05 |
| Cogumelos (exceto os do gênero <i>Agaricus</i> , <i>Pleurotus</i> e <i>Lentinula</i> ou <i>Lentinus</i>) | 0,05 |

| | |
|--|------------------------------|
| Hortalças leguminosas | 0,10 |
| Alimento | Valor Max. permitido* |
| Legumes (sementes secas das legumiosas) exceto soja | 0,10 |
| Cogumelos do gênero <i>Agaricus</i> , <i>Pleurotus</i> e <i>Lentinula</i> ou <i>Lentinus</i> | 0,20 |
| Raízes e tubérculos | 0,10 |
| Hastes jovens e pecíolos | 0,10 |
| Frutas frescas, excluídas as de bagos e pequenas | 0,05 |
| Frutas frescas de bagos e pequenas | 0,05 |
| Chá, erva mate, e outros vegetais para infusão | 0,40 |
| Café torrado em grãos e pó | 0,10 |
| Café solúvel em pó ou granulado | 0,20 |
| Gelos comestíveis | 0,05 |
| Sorvetes de água saborizados | 0,01 |
| Sorvetes de leite ou creme | 0,05 |
| Sorvetes a base de frutas | 0,05 |
| Leite fluído e produtos lácteos sem adição, sem diluir ou concentrar | 0,05 |
| Creme de leite | 0,20 |
| Leite condensado e doce de leite | 0,10 |
| Queijos | 0,50 |
| Sal para consumo humano | 0,50 |
| Carnes de bovinos, ovinos, suínos, caprinos e aves de curral, derivados crus, congelados ou refrigerados, embutidos e empanados crus | 0,05 |
| Fígado de bovinos, ovinos, suínos, caprinos e aves de curral | 0,50 |
| Rins de bovinos, ovinos, suínos, caprinos | 1,00 |
| Peixes crus, congelados ou refrigerados | 0,05 |

* Valores expressos em mg/100 kg;

** valor em mg/L;

Fonte: BRASIL, 2013.

Pela tabela, pode-se observar que as concentrações são muito baixas, da ordem de $\mu\text{g/Kg}$, o que se torna um problema para a sua quantificação, devido à baixa sensibilidade das técnicas analíticas mais comuns, como é o caso da espectrometria de absorção atômica em chama (F AAS). Dessa forma se faz necessário a implementação de técnicas de pré-concentração associada à uma técnica de quantificação, que no estudo foi utilizada a F AAS.

1.3 Técnicas de pré-concentração: A Microextração em Fase Líquida

Muitos são os métodos descritos e desenvolvidos atualmente que possibilitam a determinação de elementos traço e ultratraço, uma vez que por estarem em quantidades muito pequenas, dificilmente seriam detectados pelos equipamentos analíticos. Os pesquisadores buscam, em geral, técnicas que possibilitem a identificação destes compostos. Diversas técnicas de pré-concentração já foram desenvolvidas acopladas à diversos equipamentos, contudo, criar novas metodologias que reduzam a quantidade de reagentes químicos empregados sem que se perca o analito em cada amostra é um dos principais objetivos da atualidade (REIS, MIRANDA e BACCAN, 1996).

A microextração em fase líquida (LPME, do inglês *Liquid Phase Microextraction*) é um conjunto de técnicas utilizadas para a pré-concentração de substâncias, que vão desde orgânicas à inorgânicas, como metais. É composta de várias técnicas diferentes, mas com um mesmo princípio: extrair o analito (orgânico ou inorgânico) da solução de origem (amostra) para uma fase orgânica que é adicionada ao meio, e na maioria das vezes é composta por um reagente mais apolar. Dessa forma, moléculas orgânicas tendem a migrar para a fase apolar (fase orgânica) do sistema, que possui um volume bem inferior ao da amostra, resultando na pré-concentração do analito (PENA-PEREIRA *et al*, 2010).

Duas dessas técnicas, a microextração por gota única (*SDME – Single Drop Microextraction*) e a microextração dispersiva líquido-líquido (*DLLME – Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*), vêm sendo muito utilizadas. Novamente, em comum incidem o fato de ambas utilizarem microvolumes de solventes orgânicos na extração e estarem de acordo com os princípios da química verde, onde um deles é a redução do uso de reagentes químicos em análises (KOCÚROVÁ *et al*, 2013).

Uma representação esquemática acerca do princípio geral das duas técnicas está mostrada na Figura 4. A Figura 5, mostra um gráfico que compara a aplicabilidade entre as quatro principais técnicas de microextração líquido-líquido em artigos publicados nos anos de 2010 a 2012. Observa-se no gráfico que DLLME foi a técnica mais utilizada no período.

Kokosa (2013) demonstra uma revisão detalhada acerca dessas técnicas e dos principais reagentes orgânicos utilizados pelos pesquisadores, e destacam-se o 1-octanol, 1-undecanol, 1-dodecanol, clorofórmio, diclorobenzeno, hexano, tolueno, metanol e etanol (esses dois últimos principalmente utilizados como dispersores). Os analitos avaliados vão desde pesticidas e outros contaminantes orgânicos até os metais. Por fim, a técnica também permite o acoplamento à diferentes instrumentos de análise, como o F AAS (espectrômetro de absorção atômica com chama – *Flame Atomic Absorbtion Spectrometer*), GF AAS (espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite – *Graphite Furnace Atomic Absorbtion Spectrometer*), ICP OES (espectrômetro de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado – *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometer*) e HPLC (Cromatografia líquida de alta eficiência – *High-performance Liquid Chromatography*).

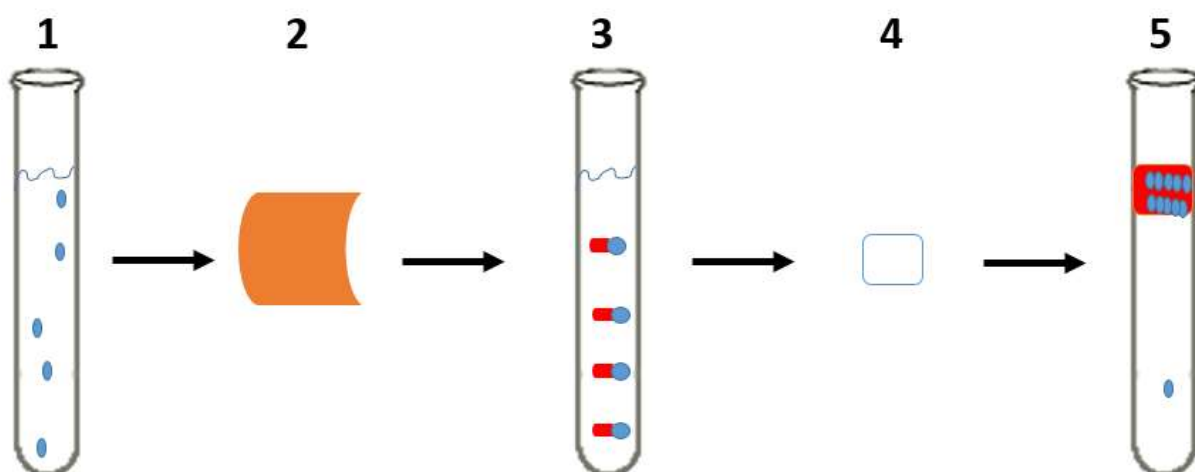


Figura 4: Representação esquemática da microextração utilizando solventes orgânicos. 1. Amostra com metal disperso (●); 2. Adição de um agente complexante (AC) (■); 3. Ligação de AC com metal (●■); 4. Adição de pequeno volume de solvente orgânico (□); 5. Separação das duas fases e pré-concentração do metal

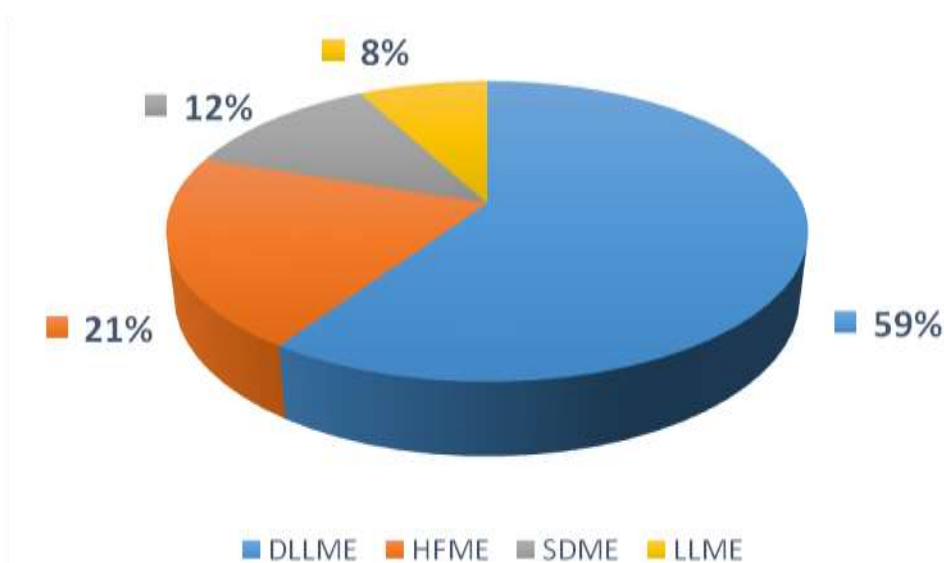


Figura 5: Proporção de trabalhos publicados utilizando as principais técnicas de microextração em fase sólida no período de 2010 a 2012. DLLME = Dispersive Liquid-Liquid Microextraction; SDME = Single Drop Microextraction; HFME = Hollow-fiber-protected microextraction; LLME= Liquid-liquid microextraction.

Fonte: KOKOSA, 2013.

1.3.1 Microextração por gota única (SDME)

A SDME consiste basicamente na adição de uma única gota do reagente orgânico extrator na fase aquosa da amostra. No geral, uma seringa de vidro com capacidade para pequenos volumes (na maioria das vezes de até 20 µL) é utilizada como meio para administrar a gota ao sistema e para retirá-la. Foi primeiro descrita por Jeannot e Cantwell em 1996, e possui basicamente duas formas principais de análise: a extração direta e a extração em *headspace*.

Como mostrado pela Figura 6, o analito pode ser extraído do meio diretamente (figura 6-A), onde a gota extratora é imersa diretamente em uma solução líquida. Já a extração em *headspace* (figura 6-B) a gota fica suspensa em um ambiente controlado sem o contato com a amostra. Dessa forma, compostos voláteis podem ser extraídos, aumentando a aplicabilidade do sistema. Como dito anteriormente, um número muito grande de trabalhos foram publicados apresentando variações para a técnica (KOKOSA, 2015).

Para o sucesso da técnica, a estabilidade da gota no sistema deve ser garantida. Nesse ponto, também reside sua principal limitação. A estabilidade pode ser entendida como a soma de todas as forças atuantes sobre a gota, seja as forças de atração e repulsão dadas pela diferença de polaridade (forças de Van der Waals, por exemplo), aceleração da gravidade, tensão interfacial e densidade. Grandes volumes de extrator, por exemplo, podem alterar a relação entre essas forças, resultando em uma separação da gota. Soma-se a esse fator o tipo de extrator usado, além de suas propriedades físicas como ponto de fusão e ebulição, viscosidade e tensão iônica (MARCINKOWSKI *et al*, 2015).

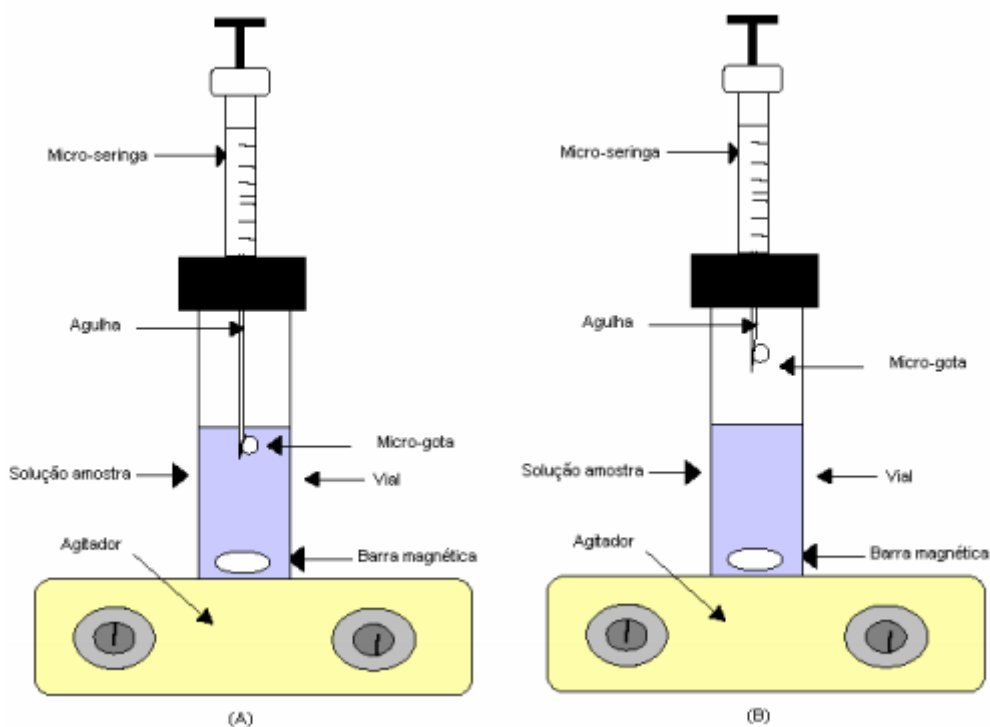


Figura 6: Variações da SDME. A: extração direta (a gota em contato com a solução); B: extração em *headspace* (contato com compostos voláteis).

Fonte: MALTEZ, 2007.

Na técnica, muitos solventes orgânicos são utilizados (1-octanol, tolueno, 1-undecanol, diclorometano, entre outros) e é crescente o número de discussões sobre esse uso. A grande toxicidade da maioria deles (seja para o pesquisador seja para o meio ambiente) tem forçado os cientistas à descoberta de novos reagentes para a análise. A utilização de líquidos iônicos tem se mostrado bem mais efetiva por

aumentaram o potencial de extração (volume da gota), estabilidade do sistema e por serem em geral menos tóxicos (SPIETELUN *et al*, 2013).

Outra alternativa para o desenvolvimento e o controle dessas limitações na SDME é a utilização do ultrassom. Almeida *et al* (2015), determinou cádmio em óleos vegetais utilizando a SDME assistida com ultrassom. Nesse processo a agitação mecânica que é utilizada na técnica original foi substituída por ultrassom, o que potencializou a extração do analito e contribuiu para diminuir o limite de detecção da técnica (que ficou em 7 ng Kg^{-1}) (ALMEIDA *et al*, 2015).

Sendo assim, a SDME originalmente criada foi otimizada com o passar dos anos, dando origem à outras técnicas como a DLLME, discutida no item 1.3.2.

1.3.2 Microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME)

Esta técnica representa uma evolução da SDME, pois uma vez em que o volume orgânico é disperso aumenta-se a superfície de contato com a fase aquosa proporcionando uma maior extração, ou ao menos aumentando-se a velocidade desta. Não por acaso, tem sido descrita como a principal técnica utilizada para microextração, como destacado na Figura 5.

A DLLME consiste simplificada de dois passos. No primeiro, é adicionado à solução aquosa da amostra (que já contenha o agente complexante adicionado) uma mistura contendo o reagente orgânico extrator e um reagente dispersor. No segundo passo, realiza-se uma centrifugação do sistema para a separação de fases. A partir de então basta apenas coletar a fase extratora e fazer a determinação usando a técnica instrumental escolhida (REZAEI *et al*, 2010).

A possibilidade de acoplamento da DLLME com diferentes técnicas instrumentais tem gerado muitos trabalhos científicos. Abadi *et al* (2012) publicou uma revisão acerca de diversos trabalhos onde combinaram a DLLME com a espectrofotometria de absorção molecular na região do ultravioleta-visível (*UV-Vis Spectrophotometry*). Novamente, os principais agentes do método descritos foram: 1) Agente complexante: PAN (1-(2-piridilazo)-2-naftol), ditizona, dimetilaminobenzaldeído; 2) Agente extrator: diclorobenzeno, clorofórmio, tetraclorometano acetato de amila; 3) Agente dispersor, o etanol ou metanol.

Utilizando essa técnica, muitos metais puderam ser determinados e incluindo principalmente metais pesados (Cd, Pb, V, Cu, Mo) (ABADI *et al*, 2012).

1.3.2.1 Utilização da DLLME acoplada à espectrometria de absorção atômica com chamas (F AAS)

O F AAS também parece ganhar muita atenção dos pesquisadores entre os equipamentos com potencial para acoplamento com a DLLME. A Tabela 2 revela alguns trabalhos que partiram desse pressuposto.

Tabela 2: Alguns estudos utilizando a DLLME e o F AAS para determinação de metais

| Agente complexante | Extrator | Dispersor | Analito | Referência |
|---------------------------|-----------------|-------------------|----------------|-------------------------|
| 8-hidroxiquinolina | 1-undecanol | Etanol | Cu | BAHAR e ZAQUERIAN, 2012 |
| 2,2'-furildioxima | Clorofórmio | Metanol | Pd | SAÇMACI, 2012 |
| 8-hidroxiquinolina | Clorofórmio | Metanol | Fe | BAHAR, 2012b |
| DPTH | Clorofórmio | Metanol | Cd | ROJAS, 2011 |
| DDTC | Clorofórmio | Triton x-114 | Cu | WEN, 2013 |
| APDC | Ácido decanóico | Tetrahydro-furano | Cd | JAFARVAND, 2011 |

O princípio da espectrometria de absorção atômica com chamas se baseia no fato de a amostra ser lançada em uma chama para que elementos sejam atomizados. Simultaneamente, um feixe de radiação com comprimento de onda específico de cada elemento em análise é incidido na chama. A diferença entre a quantidade do feixe que chegou ao detector e a quantidade que foi absorvida pelo analito na chama é usada como parâmetro para a quantificação. Devido à maior simplicidade dos equipamentos e maior facilidade de aquisição, grupos e institutos de pesquisa utilizam o F AAS com uma grande prevalência. Esse fato justifica a

escolha do F AAS para o acoplamento de técnicas de pré-concentração de metais (SKOOG, 2006).

Bahar e Zaquerian (2012) estudaram o efeito de duas diferentes misturas envolvendo extratores e dispersores e o acoplamento ao F AAS. No primeiro deles o 1-undecanol e o etanol foram utilizados para a determinação do Cu em cabelo humano e amostras de chá, utilizando 8-hidroquinolina como complexante. Como o 1-undecanol se solidifica em temperaturas de refrigeração (próximo a 4°C) essa propriedade foi utilizada como variação da DLLME, que a chamaram microextração líquido-líquido dispersiva com solidificação da gota flutuante (DLLME-SFO). Esta se mostrou eficaz, com baixo limite de detecção (3,4 ng mL⁻¹) e fator de enriquecimento de 28 (BAHAR e ZAKERIAN, 2012). No segundo trabalho, realizaram a mistura envolvendo clorofórmio e metanol para extrair Fe em amostras de água. Nesse caso o fator de enriquecimento foi de 462 e o limite de detecção de 4,5 ng mL⁻¹, revelando que as duas misturas poderiam ser usadas para a determinação de metais (BAHAR e ZAKERIAN, 2012b).

A utilização do clorofórmio e do metanol também foi descrito por outros autores (SAÇMACI *et al*, 2012; ROJAS *et al*, 2011). Os métodos desenvolvidos também se mostraram efetivos quando determinaram Pd e Cu, respectivamente. O F AAS também foi escolhido nesse caso.

Já Wen *et al* (2013) comparou duas variações da DLLME (assistida com ultrassom e assistida com surfactante) com a técnica convencional para determinação de Cu. Mais uma vez, o F AAS foi escolhido para ser acoplado aos métodos. Com os resultados, concluiu-se que o uso do ultrassom foi amplamente superior às outras duas técnicas, refletido pelo menor limite de detecção (0,6 µg L⁻¹, contra 0,8 µg L⁻¹ para a que utilizou surfactantes e 1,0 µg L⁻¹ para a técnica convencional). Os autores ainda destacaram o maior fator de enriquecimento e que a técnica apresentou resultados satisfatórios para a determinação do Cu em água (WEN *et al*, 2013).

1.5 Reconhecimento de Padrões: Análises exploratórias de dados

Desde quando iniciamos a nossa vida a necessidade de observar e identificar diferenças ganha um grande espaço. Aprender a diferença entre círculo e quadrado,

cores, letras, objetos, sons e números por exemplo, faz parte do nosso aprendizado. Sendo assim, é necessário desenvolvermos mecanismos de reconhecimento de padrões para todas as nossas observações. Nesse ponto, químicos começaram a perceber a necessidade do desenvolvimento de ferramentas para a identificação de dados químicos, que se relacionam com concentração de substâncias, sinais de detecção dos equipamentos utilizados, valores de medida de um ambiente controlado (temperatura, intensidade de luz, pH, etc.). Para avaliar melhor o comportamento destas variáveis, desenvolveu-se as Análises exploratórias de dados (BEEBE, 1998).

Observar dados numéricos quando se têm um grande número de variáveis pode ser bastante moroso quando expostos lado a lado. Nesse sentido, as análises exploratórias dos dados surgem como alternativa muito viável, pois esses dados são plotados em gráficos sem que se perca a informação. Assim, além de facilitar o processo de análise, permite uma melhor visualização na apresentação dos resultados. Entre elas, destacam-se a Análise de Componentes Principais (PCA – *Principal Components Analysis*) e a Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA – *Hierarchical Cluster Analysis*) (CORREIA e FERREIRA, 2007).

1.5.1 Análise de Componentes Principais (PCA)

A PCA é uma técnica de análise exploratória de dados que permite observar os dados multivariados a partir de um diferente ponto de vista. Ela é conhecida por definir combinações lineares entre os dados criando novas variáveis, as PC's ou Componentes Principais. Cada PC contém uma quantidade percentual da variação dos dados, ou quantidade da informação, e as subsequentes geradas trazem o percentual restante dessa informação. Dessa maneira, ao analisarmos uma componente *versus* a outra reduzimos consideravelmente a complexidade da análise dos dados, sem alterar o teor da informação original (WEHRENS, 2011).

Podemos entender o funcionamento da PCA quando observamos um desenho experimental esquemático de duas variáveis. Pelo fato de conter apenas duas variáveis neste exemplo, a compreensão dos dados também é facilitada bem

como sua demonstração pela PCA. Consideraremos que os dados plotados sejam os mostrados na Tabela 3.

Tabela 3: Exemplo de um conjunto de dados de duas variáveis

| Amostra | Variável 1 | Variável 2 |
|----------------|--------------------|--------------------|
| <i>A</i> | <i>Resultado 1</i> | <i>Resultado 2</i> |
| <i>B</i> | <i>Resultado 3</i> | <i>Resultado 4</i> |
| <i>C</i> | <i>Resultado 5</i> | <i>Resultado 6</i> |
| <i>D</i> | <i>Resultado 7</i> | <i>Resultado 8</i> |

Quando plotamos as informações obtidas através da análise da PCA observamos a geração de duas novas variáveis conforme mostrado na Figura 7. Através dela é possível perceber que a maior parte da variação, ou informação dos dados nesse caso, está contida na PC1 e um resto na PC2. Se o número de variáveis fosse sensivelmente maior, mais PC's seriam geradas, cada um com um percentual de informação, porém o padrão de as primeiras conterem um grande percentual de informação se mantém. Dessa maneira ao analisar PC1 x PC2, por exemplo, temos quase a totalidade da informação (nesse caso 100%) (BEEBE, 1998).

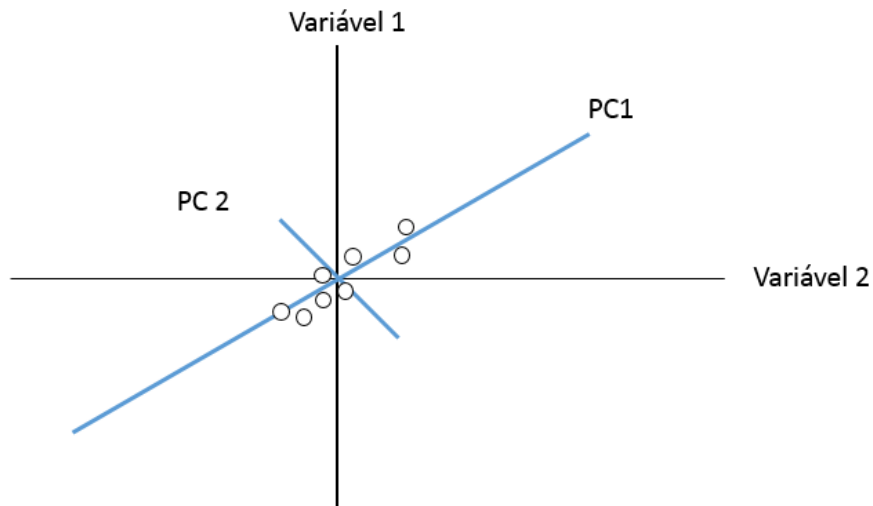


Figura 7: Representação da plotagem dos dados através da Análise de Componentes Principais. Cada bolinha representa uma linha na matriz dos dados e representa a interação entre a variável 1 e a variável 2.

Fonte: (BEEBE, 1998).

Como o objetivo principal da PCA é observar o resultado das análises em função das variáveis é possível observar a relação através de dois gráficos: gráfico de pesos e gráfico de escores. O primeiro é gerado quando plotamos as variáveis no espaço das PC's em função das linhas (que trazem os dados das amostras, por exemplo) e o outro inverte-se essa lógica. Em outras palavras, os dois gráficos se complementam e a conclusão geral do estudo é estabelecida a partir dos dois (WEHRENS, 2011).

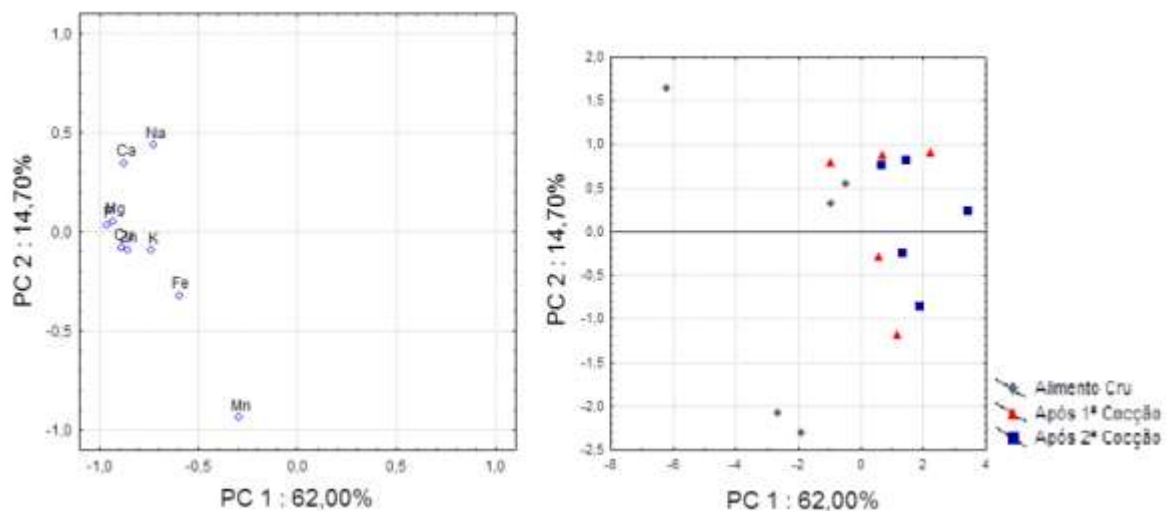


Figura 8: Exemplo de gráficos de pesos e escores. No gráfico da esquerda, as variáveis (metals) foram plotadas e no gráfico da direita foram plotadas as amostras.

Notar que há uma complementariedade de informações, de modo que só é possível entender um através da comparação com o outro.

1.5.2 Análise de agrupamento hierárquico (HCA)

A análise de agrupamento hierárquico (HCA – *Hierarchical Cluster Analysis*), também conhecida como Análise de Cluster, visa o agrupamento dos dados através de classes similares ou diferenciados através de classes diferentes. Em outras palavras, a HCA mede a distância ou proximidade entre os dados e permite que esse agrupamento seja observado graficamente (CORREIA e FERREIRA, 2007).

Um dendograma é o gráfico onde são representados os agrupamentos dos dados. Variações das técnicas podem incluir a metodologia para a medida da distância entre os dados, que pode incluir a distância euclidiana, ligação centroide, distância Mahalanobis, entre outras. Um exemplo do dendograma é representado na Figura 9 (MILLER e MILLER, 2010).

Sendo assim, utilizando as duas técnicas de análise exploratória dos dados há um maior entendimento acerca do comportamento dos dados obtidos em análises multivariadas, como é o caso de análises com muitas amostras de diferentes localidades onde se avalia um teor de um grande número de elementos, por exemplo.

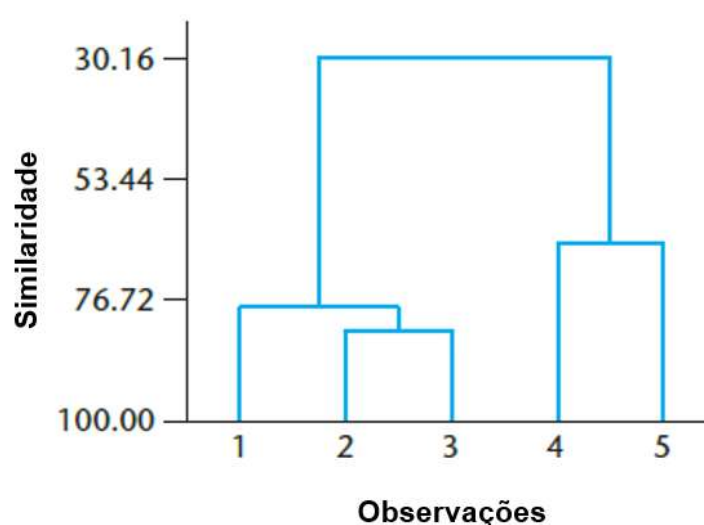


Figura 9: Exemplo de um dendograma.

Fonte: MILLER, 2010.

2. Justificativa

A crescente preocupação com as questões ambientais e de saúde tem levado a uma gama de estudos no sentido de que se possam ser geradas técnicas e/ou conhecimentos que minimizem a ação do homem no ambiente. Determinar metais tóxicos é um dos parâmetros para se ter uma noção da gravidade da contaminação em que o meio se encontra, uma vez que a presença desses metais em alimentos (principalmente os vegetais consumidos na sua forma integral e crua) já foi descrita pela literatura, sendo a sua fonte principal o solo e a água. Juntamente com a contaminação no alimento o ser que faz a ingestão deste, pode vir a apresentar também os efeitos tóxicos de cada metal (TOPPI e GABRIELLI, 1999; PERALTA-VIDEA *et al*, 2009).

A alface é a hortaliça mais comercializada e consumida no Brasil devido a seu fácil cultivo e sua rica composição (principalmente de minerais e vitaminas). Além disso, ela é muito sensível à presença de elementos tóxicos presentes no solo e estes elementos podem se acumular na planta, se tornando um meio da “biotransição” de metais tóxicos entre os seres vivos, sendo por este motivo que ela foi escolhida neste estudo.

O cádmio, um desses metais tóxicos, é caracterizado por causar agravos mesmo em quantidades baixas, como demonstrado em diversos trabalhos encontrados na literatura, principalmente por sua bioacumulação em vegetais. Dessa forma, o conhecimento acerca dos alimentos produzidos, principalmente oriundos da agricultura familiar que são em geral muito consumidos pela maioria da população, permite caracterizar a qualidade do produto oferecido, bem como a garantia de uma nutrição saudável.

3. Objetivos:

3.1 OBJETIVO GERAL:

Desenvolver um método analítico para a determinação de cádmio em amostras de alface cultivadas em diferentes regiões da Bahia.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Usar técnicas de planejamento de experimentos da estatística multivariada para otimização do método proposto;
- Otimizar o processo de digestão de amostras de alface;
- Avaliar as características analíticas para o método proposto;
- Aplicar a técnica DLLME para a pré-concentração de cádmio em amostras de alface;
- Usar técnicas de análise exploratória de dados para traçar um perfil das amostras estudadas;
- Utilizar um dos princípios da química verde que é a redução da quantidade de substâncias orgânicas em análises químicas.

4. Materiais e métodos

4.1. Equipamentos utilizados

Os equipamentos utilizados para todas as etapas do desenvolvimento e análise estão listados a seguir:

- Espectrofotômetro de Absorção Atômica com Chamas (F AAS), modelo novAA 300, da Analytik Jena®;
- Ultrapurificador de água, modelo Milli-Q®, da Millipore;
- Bomba peristáltica MILAN®;
- Balança analítica, modelo AY220, da Shimadzu®;
- Medidor de pH, MS TecnoPON®;
- Moinho de facas, marca Cuisinart®;
- Estufa para secagem das amostras, da NOVA ÉTICA®;
- Centrífuga de bancada para tubos de 15mL, CentriBIO®;

4.2. Preparo das soluções

As soluções foram preparadas utilizando água obtida do Sistema de purificação de água Milli-Q®, processadas no instante do preparo dos reagentes (a água purificada não era estocada). As vidrarias utilizadas nos processos foram mantidas em solução de ácido nítrico a 10% (v/v) por 12 horas, a fim de se reduzir a probabilidade de contaminação cruzada com metais durante as etapas.

4.2.1 Soluções de referência / trabalho IUPAC de metais

As soluções-padrão dos metais cádmio, cobre, chumbo, ferro, níquel e zinco à 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ foram preparadas diluindo 100 μL de soluções certificadas 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (FLUKA-TraceCERT®) em 100 mL de água ultrapura.

4.2.3 Solução estoque de 5-Br-PADAP 0,01% (m/v)

Pesou-se 0,01 g de 5-Br-PADAP (SIGMA-ALDRICH), transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se com álcool etílico 99,8% (v/v).

4.2.4 Soluções de ácido nítrico e clorídrico à 0,5 mol L⁻¹

Quantidades apropriadas dos ácidos nítrico e clorídrico (SIGMA-ALDRICH) foram medidas e diluídas em água ultrapura.

4.2.5 Soluções-tampão utilizadas

As soluções-tampão utilizadas foram preparadas medindo-se a massa do reagente envolvido para que a concentração final fosse de 0,1 mol L⁻¹. Após a dissolução em água ultrapurificada, o pH foi então ajustado para o valor desejado com soluções de ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹ e hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹. As soluções tampões utilizados foram os seguintes:

4.2.5.1 Tampão bicarbonato / Hidróxido de sódio (pH 10,88)

Pesou-se 8,401g de bicarbonato de sódio, diluiu-se em cerca de 600mL de água ultrapura e ajustou-se o pH do meio para 10,88 com uma solução de hidróxido de sódio 1 mol L⁻¹. Após isso, transferiu-se para um balão volumétrico de 1 litro e completou-se o volume com água ultrapura. A medida de pH se deu com auxílio de um pHmetro.

4.2.5.2 Tampão bicarbonato / Hidróxido de sódio (pH 11,00)

Pesou-se 8,401g de bicarbonato de sódio, diluiu-se em cerca de 600mL de água ultrapura e ajustou-se o pH do meio para 11,00 com uma solução de hidróxido de sódio 1 mol L⁻¹. Após isso, transferiu-se para um balão volumétrico de 1 litro e completou-se o volume com água ultrapura. A medida de pH se deu com auxílio de um pHmetro.

4.2.5.3 Tampão fosfato monobásico de sódio / fosfato bibásico de sódio (pH 7,00)

Pesou-se 11,9g de fosfato monobásico de sódio anidro e 14,96g de fosfato bibásico de sódio, diluiu-se ambas as massas em cerca de 600mL de água ultrapura e ajustou-se o pH do meio para 7,00 com uma solução de hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹. Após isso, transferiu-se para um balão volumétrico de 1 litro e completou-se o volume com água ultrapura. A medida de pH se deu com auxílio de um pHmetro.

4.2.5.4 Tampão Borato / Ácido bórico (pH 9,00)

Pesou-se 38,137g de borato de sódio decahidratado e 6,83g de ácido bórico, diluiu-se ambas as massas em cerca de 600mL de água ultrapura e ajustou-se o pH do meio para 7,00 com uma solução de hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹. Após isso, transferiu-se para um balão volumétrico de 1 litro e completou-se o volume com água ultrapura. A medida de pH se deu com auxílio de um pHmetro.

4.3. Coleta das Amostras

As amostras foram coletadas em feiras livres das cidades de Barreiras, Boquira, Brumado, Caculé, Caetité, Candiba, Eunápolis, Feira de Santana, Guanambi, Macaúbas, Malhada de Pedras, Riacho de Santana, Ribeirão do Largo, Salvador e Vitória da Conquista, todas elas pertencentes ao Estado da Bahia, no período de junho à setembro de 2014. Cada amostra pesava cerca de 0,4 Kg (uma unidade de alface).

Objetivo de se coletar em feiras livres era de obter uma amostra cultivada na cidade, principalmente oriunda de pequenos agricultores, e, assim, garantir a distribuição geográfica das amostras. Após a coleta, as amostras foram trazidas para o Laboratório de química analítica da Universidade Federal da Bahia, Campus Anísio Teixeira, em Vitória da Conquista – Bahia.

4.4 Preparo das amostras

Após chegarem ao laboratório, as amostras foram lavadas em água corrente, descontaminadas em uma solução de hipoclorito de sódio 0,5% (v/v) por 15 minutos e secas à 60°C em uma estufa por durante 24-32 horas. Durante a secagem fez-se necessário controlar a umidade interna da estufa, a fim de evitar a contaminação/depreciação da amostra. Com as amostras secas, utilizou-se um moinho de facas para pulverizá-las.

4.5 Digestão das amostras

Aproximadamente 0,05g das amostras secas e pulverizadas foram colocadas em cápsulas de digestão ácidas projetadas para uso em aparelho de micro-ondas convencional (*PARR® Bomb Vessel*) e adicionou-se 800 µL de ácido nítrico (SIGMA-ALDRICH®), 400 µL de peróxido de hidrogênio (VETEC®) e 1200 µL de água ultrapura (Sistema Milli-Q® – Millipore). O tempo total de digestão foi de 12 minutos, divididos em intervalos de 2 minutos, para garantir a segurança do processo, em uma potência de 90% do aparelho. Todo o processo de amostragem se deu em triplicata da amostra.

Terminado o processo de digestão, dada pela observação do resíduo líquido resultante (este se torna incolor sem a presença de precipitados visíveis à olho nu), a amostra digerida foi transferida para balões de 5 mL, onde foi adicionado 700 µL de uma solução de hidróxido de sódio 12,54 mol L⁻¹, a fim de se neutralizar o excedente ácido resultante da digestão. As amostras digeridas foram armazenadas em tubos de polipropileno (TPP®) até o momento da análise.

4.6 Sistema de pré-concentração proposto para o cádmio

Uma mistura extratora, contendo um reagente apolar (extrator) o 1-octanol e um reagente anfipático (dispersor) o etanol, foi adicionada aos padrões e a amostra, previamente tratados com um agente complexante o 5-Br-PADAP. Às amostras e aos padrões, adicionaram-se uma solução tampão para manter o pH na faixa

favorável a complexação (utilizou-se os tampões e faixas descritas no item 4.2.5). Em seguida a mistura foi centrifugada por 15 minutos a 3200 rpm. A próxima etapa consistiu em remover a gota (fase rica) formada na superfície da solução transferida para um tubo cônico de 2,5 mL e avolumado até 500 µL com etanol absoluto. As soluções finais foram levadas para a determinação do cádmio no F AAS.

4.7 Determinação de Cu, Mg, Ca, Fe e Zn

Para os demais elementos a determinação foi realizada sem a etapa de pré-concentração, ou seja, após serem digeridas (descritas no item 4.5), as amostras foram injetadas diretamente no F AAS e os resultados de concentração computados. Para cada elemento foi construída uma curva de calibração externa e seus limites de detecção e quantificação calculados.

5. RESULTADOS

Os resultados descritos, representam os parâmetros de desenvolvimento e validação do método proposto. A etapa de desenvolvimento foi conduzida através do planejamento fatorial de dois níveis e do desenho de planejamento proposto por Box e Behnken (1960). A validação do método foi conduzida com as figuras de mérito limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), linearidade, fator de enriquecimento, precisão, robustez, análise de interferentes, teste de recuperação e aplicação do método. As etapas foram conduzidas de acordo descrito pelos autores (MILLER e MILLER, 2010; BRERETON, 2007; DEMING e MORGAN, 1987).

5.1. Desenvolvimento do método para a determinação de cádmio

5.1.1. Pré-etapa do desenvolvimento do método: Planejamento Univariado

Foi realizado um planejamento univariado para duas das variáveis do estudo, escolhidas de forma objetiva, com o intuito de conhecer o comportamento do sistema. Nesse estudo, a concentração do agente complexante utilizado (5-Br-PADAP) e o volume do reagente extrator (1-octanol) foram variados.

No primeiro estudo, o volume da gota (1-octanol) foi fixado em 40 μL , a concentração do metal fixado em 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ e a concentração do agente complexante foi variada de $1,25 \cdot 10^{-4} \%$ (m/v) a $1,25 \cdot 10^{-3} \%$ (m/v), conforme visualizado na Figura 10.

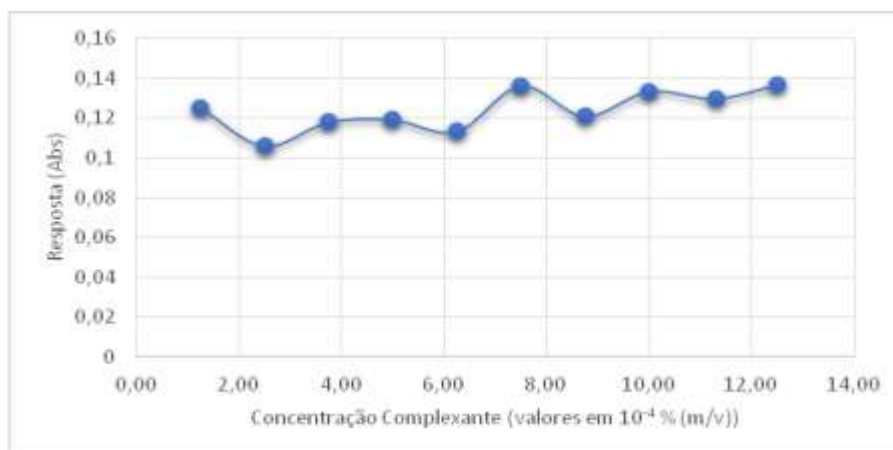


Figura 10: Estudo do efeito do aumento da concentração do agente complexante sobre a sensibilidade do método

Já no segundo estudo, a concentração metal foi mantida em $50 \mu\text{g L}^{-1}$, mas a concentração do agente complexante foi mantida em $6,25 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e o volume da gota de extrator foi variado de $10 \mu\text{L}$ à $100 \mu\text{L}$, com intervalos de 10 em $10 \mu\text{L}$. O resultado está mostrado na Figura 11.

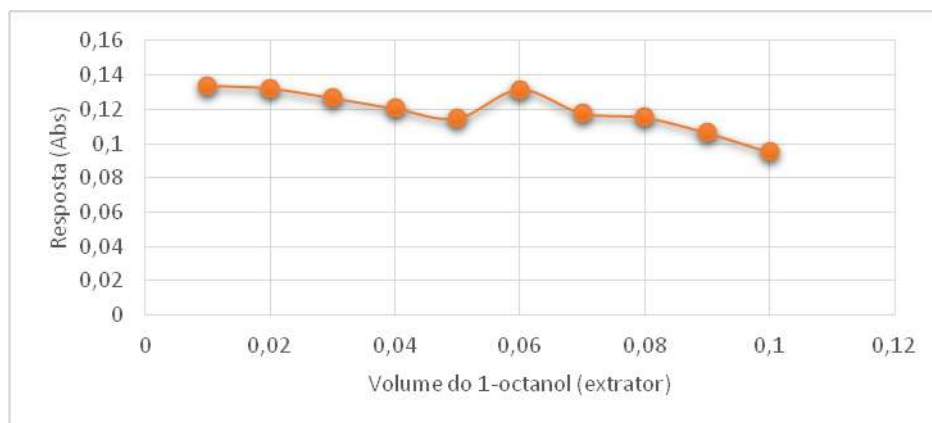


Figura 11: Efeito da variação do volume da gota do reagente extrator

5.1.2 Planejamento fatorial de 2 níveis

Após a etapa do estudo univariado, realizou-se um planejamento fatorial de 2 níveis, seguindo a equação $2^n + pc$, onde n corresponde ao número de variáveis escolhidas para o estudo (4) e pc corresponde ao número de repetição dos pontos centrais. As variáveis escolhidas para o estudo foram: pH (1), concentração do agente complexante (2), volume do agente dispersor (3) e volume do reagente extrator – GOTA (4). Os parâmetros e os níveis de variação estão mostrados na Tabela 4.

Tabela 4: Níveis dos parâmetros variáveis para o planejamento fatorial de 2 níveis

| Parâmetros Variáveis | | | |
|---------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Variáveis | Níveis | | |
| | -1 | 0 | 1 |
| pH | 7,00 | 9,00 | 11,00 |
| Conc. Complexante (em % de m/v) | $1,25 \cdot 10^{-4}$ | $5,00 \cdot 10^{-4}$ | $8,75 \cdot 10^{-4}$ |

| | | | |
|-------------------------------|-------------------------|---------|---------|
| Vol. Dispensor | 0,5mL | 0,8 mL | 1,1 mL |
| Vol. Extrator | 0,03 mL | 0,06 mL | 0,09 mL |
| Parâmetros Fixos | | | |
| Volume final | 8 mL | | |
| Concentração de cádmio | 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ | | |
| Tempo de centrifugação | 15 min | | |
| Rotação da centrífuga | 3200 rpm | | |

Após a escolha dos parâmetros, a matriz de planejamento obtida manteve os seguintes resultados mostrados na Tabela 5:

Tabela 5: Matriz e resultado do Planejamento fatorial de 2 níveis

| Experimento | Variáveis | | | | Resposta (Abs) |
|-------------|-----------|--------------------------|------------------|-----------------|----------------|
| | pH | Concentração Complexante | Volume Dispensor | Volume Extrator | |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,13650 |
| 2 | 1 | 1 | 1 | -1 | 0,15910 |
| 3 | 1 | 1 | -1 | 1 | 0,12365 |
| 4 | 1 | 1 | -1 | -1 | 0,14463 |
| 5 | 1 | -1 | 1 | 1 | 0,14685 |
| 6 | 1 | -1 | 1 | -1 | 0,15178 |
| 7 | 1 | -1 | -1 | 1 | 0,13368 |
| 8 | 1 | -1 | -1 | -1 | 0,16393 |
| 9 | -1 | 1 | 1 | 1 | 0,09563 |
| 10 | -1 | 1 | 1 | -1 | 0,11560 |
| 11 | -1 | 1 | -1 | 1 | 0,07616 |
| 12 | -1 | 1 | -1 | -1 | 0,09025 |
| 13 | -1 | -1 | 1 | 1 | 0,04901 |
| 14 | -1 | -1 | 1 | -1 | 0,01902 |
| 15 | -1 | -1 | -1 | 1 | 0,03198 |
| 16 | -1 | -1 | -1 | -1 | 0,05735 |
| Pc | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,17960 |
| Pc | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,17013 |
| Pc | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,17280 |

* Pc: ponto central;

Aos dados, após obtidos foram analisados no programa Statistica 10.0, obtendo os resultados expressos nas Figura 12 a Figura 14, representados à seguir:

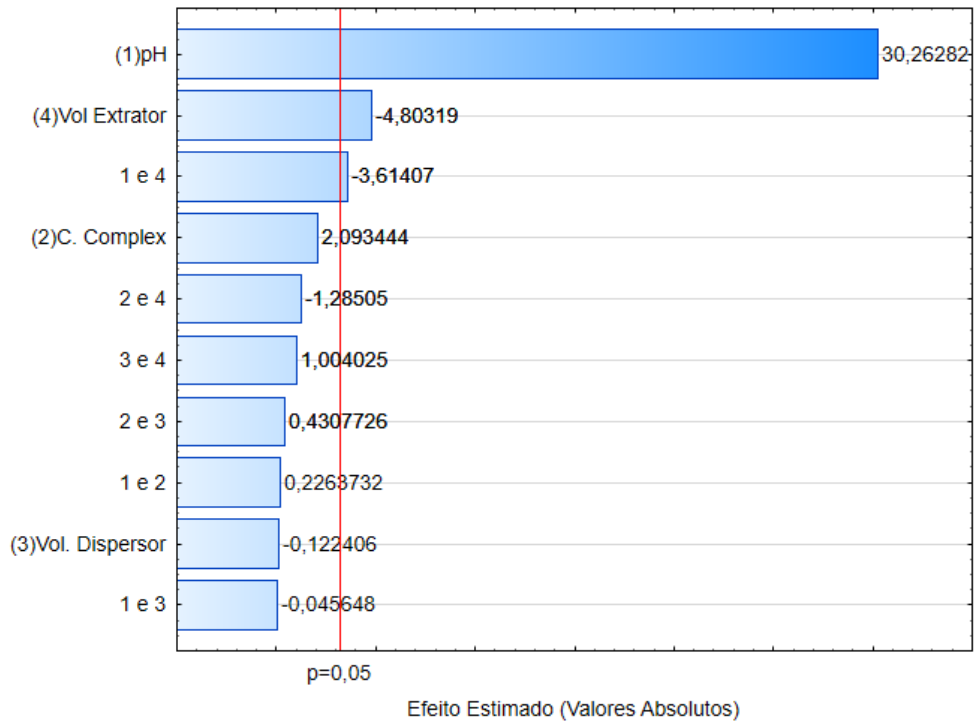


Figura 12: Gráfico de Pareto mostrando os efeitos das variáveis estudadas durante o Planejamento fatorial de 2 níveis

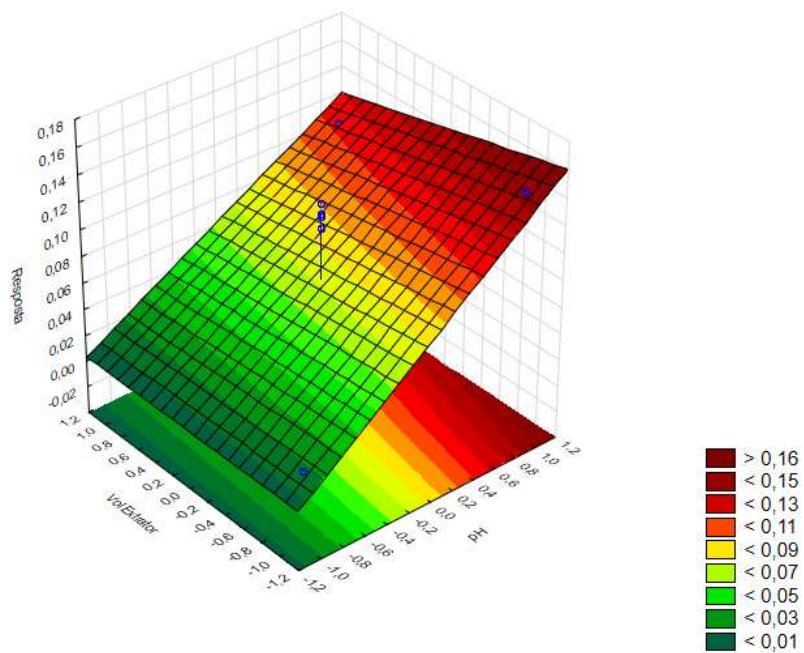


Figura 13: Superfície de resposta Volume do extrator em função do pH

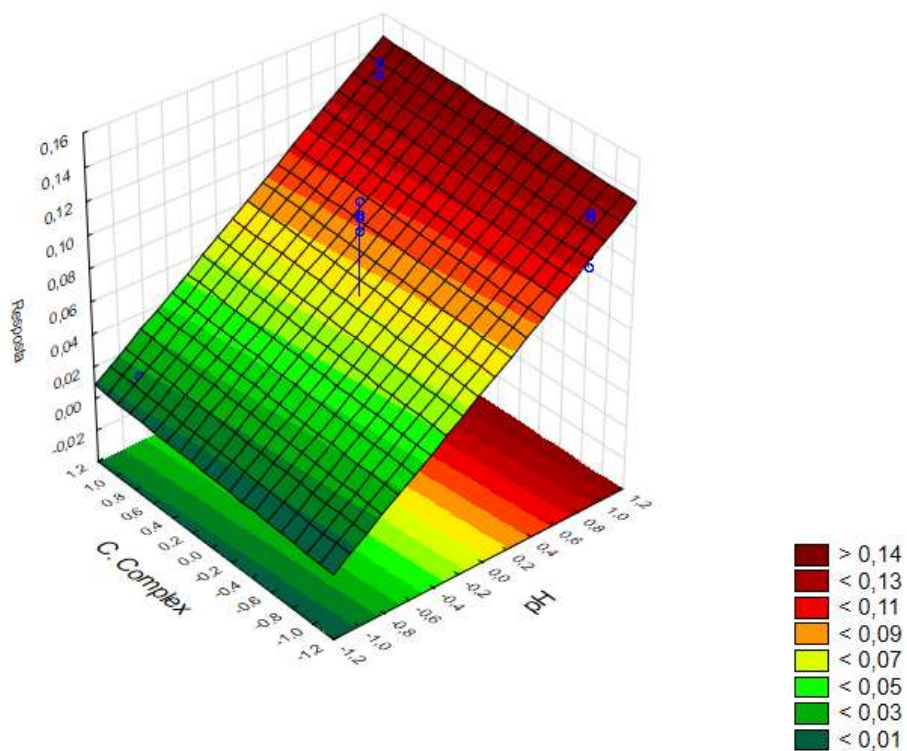


Figura 14: Superfície de resposta do efeito do pH em função da Concentração do complexante

5.1.3 Otimização do método usando o desenho Box-Behnken

Após a etapa de triagem das variáveis escolhidas para o estudo, realizou-se uma etapa de otimização do método, para identificar os pontos críticos (otimizados) para as variáveis escolhidas. Nesse ponto, ao passo que o volume do dispersor (etanol) não interferiu na resposta, o seu valor foi fixado em 0,8 mL, tendo em vista o menor consumo do reagente. A matriz de planejamento e os resultados obtidos para cada ensaio estão dispostos na Tabela 6.

Tabela 6: Matriz de planejamento usando o desenho Box-Behnken para 3 variáveis

| Ensaio | pH | Concentração Complexante* | Volume Extrator** | Resposta*** |
|--------|----|---------------------------|-------------------|-------------|
| 1 | 10 | $5,00 \cdot 10^{-4}$ | 0,040 | 0,12575 |
| 2 | 12 | $5,00 \cdot 10^{-4}$ | 0,040 | 0,10993 |

| Ensaio | pH | Concentração Complexante* | Volume Extrator** | Resposta*** |
|--------|----|---------------------------|-------------------|-------------|
| 3 | 10 | $8,75 \cdot 10^{-4}$ | 0,040 | 0,10745 |
| 4 | 12 | $8,75 \cdot 10^{-4}$ | 0,040 | 0,11950 |
| 5 | 10 | $6,88 \cdot 10^{-4}$ | 0,030 | 0,12500 |
| 6 | 12 | $6,88 \cdot 10^{-4}$ | 0,030 | 0,11655 |
| 7 | 10 | $6,88 \cdot 10^{-4}$ | 0,050 | 0,10573 |
| 8 | 12 | $6,88 \cdot 10^{-4}$ | 0,050 | 0,11440 |
| 9 | 11 | $5,00 \cdot 10^{-4}$ | 0,030 | 0,12613 |
| 10 | 11 | $8,75 \cdot 10^{-4}$ | 0,030 | 0,12105 |
| 11 | 11 | $5,00 \cdot 10^{-4}$ | 0,050 | 0,10615 |
| 12 | 11 | $8,75 \cdot 10^{-4}$ | 0,050 | 0,11765 |
| 13 | 11 | $6,88 \cdot 10^{-4}$ | 0,040 | 0,12530 |
| 14 | 11 | $6,88 \cdot 10^{-4}$ | 0,040 | 0,12820 |
| 15 | 11 | $6,88 \cdot 10^{-4}$ | 0,040 | 0,12735 |

* valores expressos em % (m/v).

** volume do extrator em mL.

*** resposta do equipamento em valores de absorvância (Abs).

Os resultados então foram processados e obteve-se os gráficos representados nas Figura 15 a Figura 18.

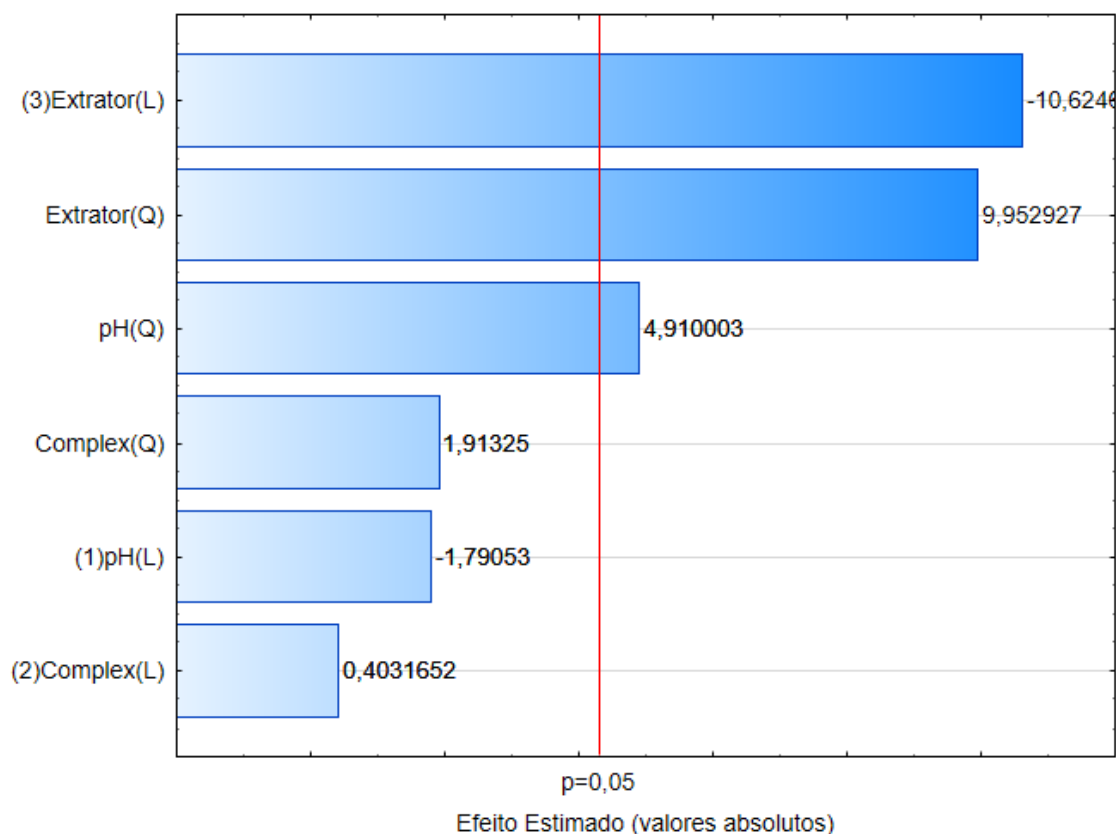


Figura 15: Gráfico de Pareto dos efeitos usando o desenho de Box-Behnken

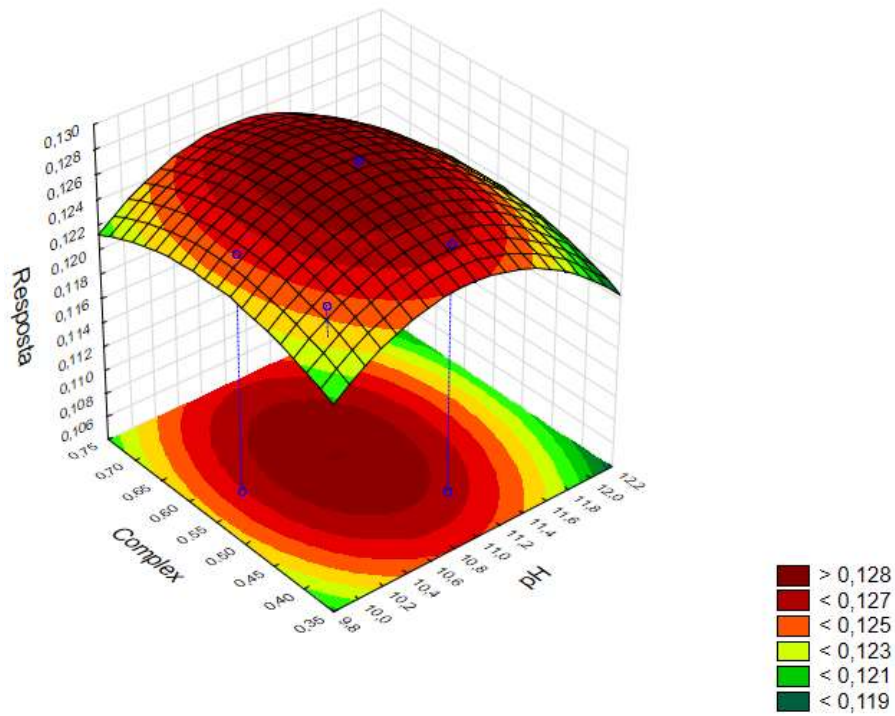


Figura 16: Superfície de resposta pH em função da concentração do complexante

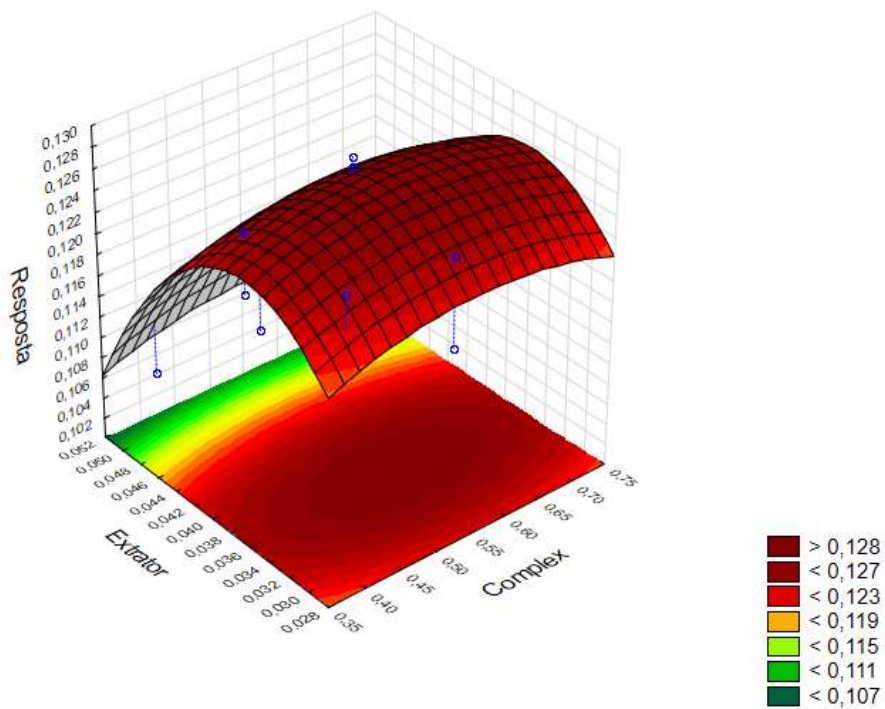


Figura 17: Superfície de resposta do efeito do Volume do Extrator e a concentração do Complexante

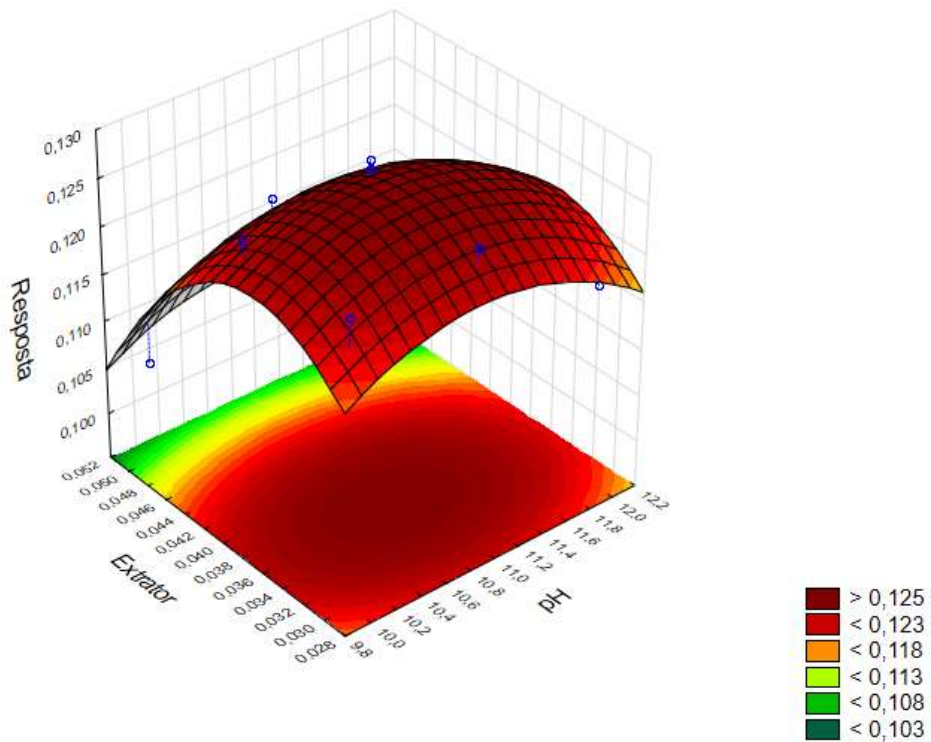


Figura 18: Superfície de resposta do efeito do Volume do Extrator em função do pH.

Após a análise estatística, encontrou-se os pontos críticos do método, que coincidem com o valor de cada variável que apresentou a maior resposta. A Tabela 7 apresenta os valores críticos após a otimização usando o desenho Box-Behnken.

Tabela 7: Valores Críticos do método após a otimização usando o desenho Box-Behnken

| Variável | Valor Mínimo Observado | Valor Crítico | Valor Máximo Observado |
|---------------------------|------------------------|----------------------|------------------------|
| pH | 10,00 | 10,88 | 12,00 |
| Conc. Complexante (% m/v) | $5,00 \cdot 10^{-4}$ | $7,01 \cdot 10^{-4}$ | $8,75 \cdot 10^{-4}$ |
| Volume do Extrator (mL) | 0,030 | 0,036 | 0,050 |

* valores processados pelo programa Statistica® 10.0, da STATSOFT;

5.1.4 Figuras de Mérito para o método desenvolvido

Com os valores otimizados para as variáveis do método desenvolvido foram realizadas figuras de mérito para a certificação e validação do mesmo. A seguir dispõe-se os resultados para os testes: Curva de Linearidade, Limite de Detecção (LD), Limite de Quantificação (LQ), Fator de Enriquecimento, Precisão, Robustez, Análise de Interferentes e Recuperação.

5.1.4.1 Curva de Linearidade

A curva de linearidade para o método proposto, com concentrações de cádmio que variaram de 0 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, com intervalos de 10 em 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, é mostrada na Figura 19. A equação obtida foi $y = -0,0064 + 0,0015x$, correspondendo à um coeficiente de determinação (r^2) de 0,9972, onde y indica o valor da resposta em valores de absorbância e x corresponde à concentração do cádmio.

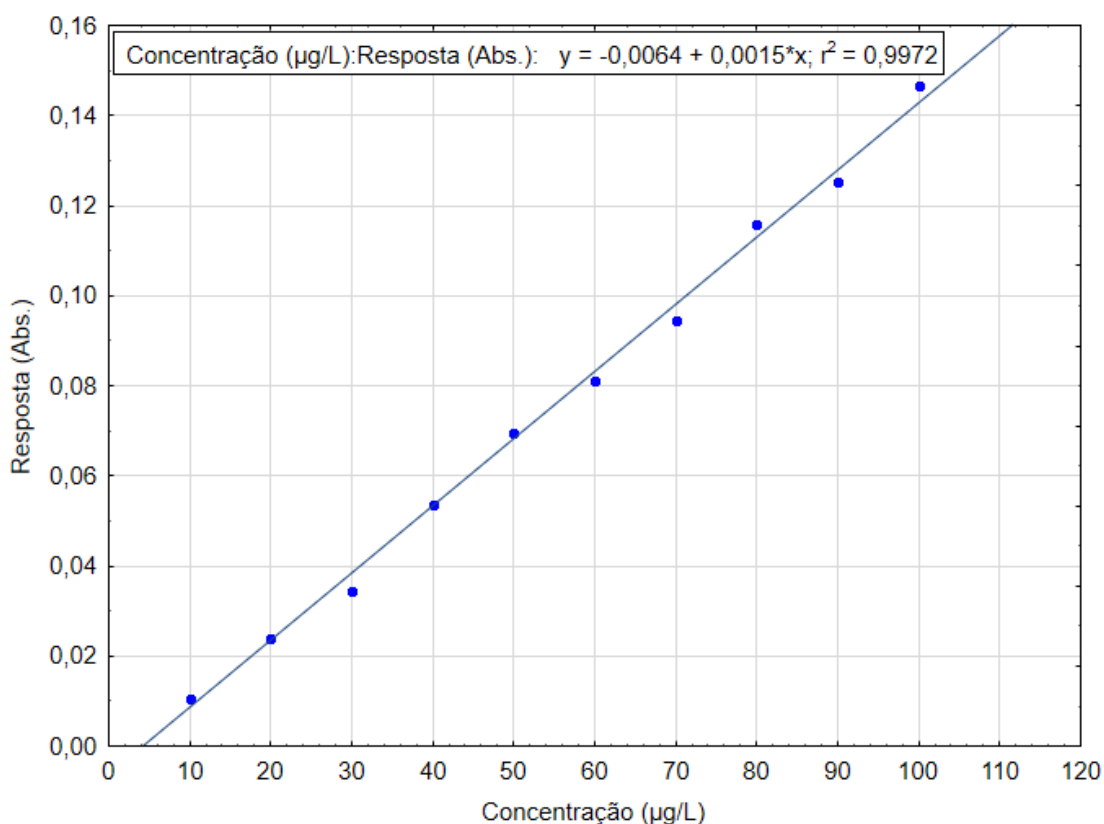


Figura 19: Curva de Linearidade para o método proposto

5.1.4.2 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Quantificar LD e LQ é um dos passos críticos para o desenvolvimento do método. O Limite de Detecção (LD) pode ser entendido como a menor concentração do analito que pode ser detectada, porém não necessariamente pode ser quantificada. Já o limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração do analito, quando empregada a técnica, que pode ser detectada e seu valor é confiável. Em outras palavras é a partir desse valor que se pode quantificar as concentrações do analito (SKOOG, 2006).

As equações que representam LD e LQ são mostradas abaixo (equações 1 e 2), e foram obtidos pela repetição do branco da curva ($n=20$ brancos) e pela inclinação da curva de linearidade obtida no item 5.1.4.1:

$$\text{Equação 1:} \quad LD = \frac{3 \times b}{a}$$

$$\text{Equação 2:} \quad LQ = \frac{10 \times b}{a}$$

onde b é o desvio padrão da repetição do branco da curva de linearidade e a é a inclinação da curva.

Os valores obtidos foram de 0,0003 $\mu\text{g/L}$ como desvio padrão do branco, LD de 0,610 $\mu\text{g/L}$ (0,00061 mg/Kg de alimento seco e 0,0000185 mg/kg de alimento *in natura*) e LQ 2,032 $\mu\text{g/L}$ (0,002 mg/Kg de alimento seco e 0,000061 mg/kg de alimento *in natura*).

5.1.4.3 Fator de Enriquecimento (FE)

Com base na curva de linearidade, também foi realizado o cálculo do fator de enriquecimento ou fator de pré-concentração para o método proposto. O teste foi realizado dividindo-se a inclinação da curva de calibração obtida no item 5.1.4.1 pela inclinação de uma curva de calibração externa (CCE) (Figura 20), feita apenas com a diluição do metal de análise (cádmio) sem passar pelo método de pré-concentração. A CCE foi feita com valores de concentração de cádmio 50 vezes superior ao valor da curva de linearidade faixa onde e modo que o equipamento detectou cádmio.

Dessa maneira, o valor obtido para o fator de enriquecimento foi de 13,58.

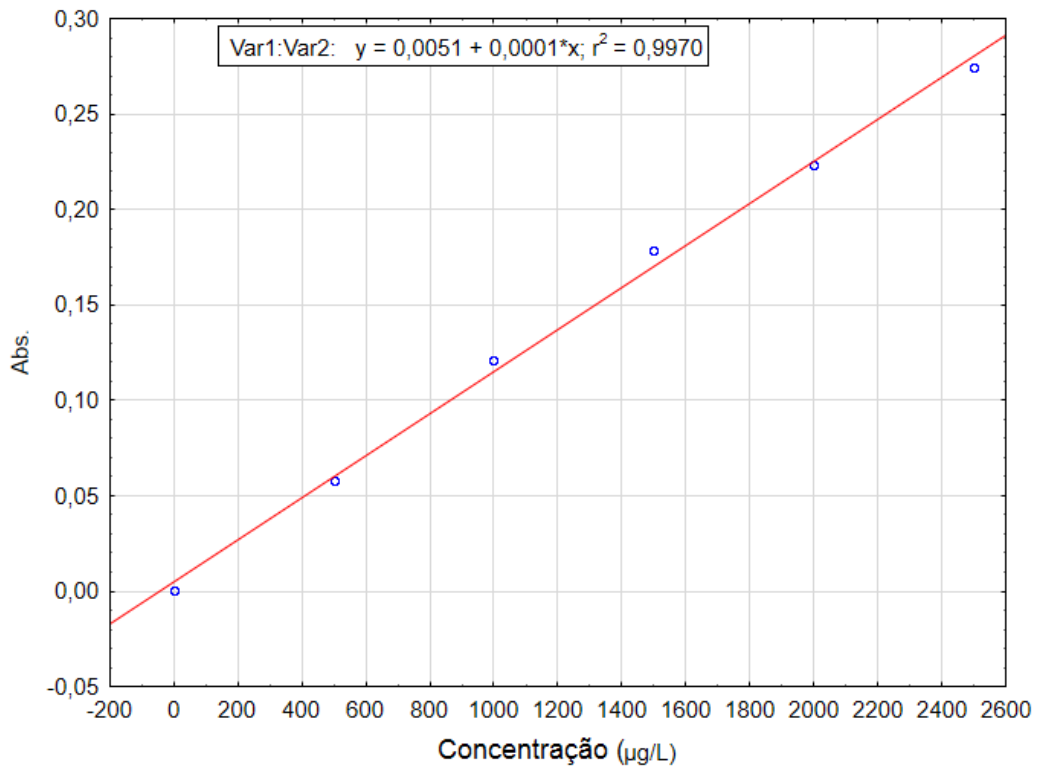


Figura 20: Curva de Calibração Externa do cádmio

5.1.4.4 Precisão (RSD)

A precisão é a medida da concordância de um resultado, ou seja, reflete o grau de concordância existente entre as medidas. É expressa matematicamente como desvio padrão relativo, ou RSD (em inglês, **Relative Standard Deviation**). O RSD é calculado pela seguinte equação:

Equação 3:
$$RSD = \frac{\sigma}{b} \times 100$$

onde σ é o desvio padrão da repetição de um ponto da curva e b é a concentração média da repetição do mesmo ponto.

Neste trabalho foram realizadas 20 medidas dos pontos de 20 µg/L e de 100 µg/L, objetivando observar a variação entre o início e o final da curva de calibração. Os valores obtidos foram de RSD 8,69% para a concentração de 20 µg/L (média: 21,04 µg/L e desvio padrão de 1,8 µg/L) e de RSD 4,86% (média 101,3 µg/L e desvio padrão de 4,96 µg/L).

5.1.4.5 Robustez

A robustez de um método analítico é definida por sua capacidade de produzir resultados constantes, quando são realizadas pequenas mudanças em suas condições ótimas de operação.

Dessa forma, realizou-se um novo planejamento fatorial de 2 níveis, para se observar se o método se mantém com valores estáveis. Para isso, as variáveis de estudo discutidas até aqui (pH, concentração do complexante, volume do agente dispersor e volume do agente extrator) foram variadas sobre os valores ótimos em 5% para mais e para menos de acordo com o mostrado na Tabela 8.

Tabela 8: Pontos de corte para a análise de Robustez do método

| Variável | Pontos de cortes | | | Taxa de variação |
|-----------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|------------------|
| | Mínimo | Central | Máximo | |
| pH | 10,34 | 10,88 | 11,42 | 5% |
| Concentração do Complexante | $6,66 \cdot 10^{-4}$ | $7,01 \cdot 10^{-4}$ | $7,36 \cdot 10^{-4}$ | 5% |
| Volume do Dispersor | 760 µL | 800 µL | 840 µL | 5% |
| Volume do Extrator | 34 µL | 36 µL | 38 µL | 5% |

Os resultados gerados após a matriz de planejamento seguem o valor da Tabela 9.

Tabela 9: Matriz do planejamento fatorial de 2 níveis para o teste de Robustez

| | pH | Conc. do Complexante | Volume do Dispensor | Volume do Extrator | Resposta |
|----|-----------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|-----------------|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,04313 |
| 2 | 1 | 1 | -1 | 1 | 0,04607 |
| 3 | 1 | 1 | 1 | -1 | 0,04099 |
| 4 | 1 | 1 | -1 | -1 | 0,04368 |
| 5 | 1 | -1 | 1 | 1 | 0,04203 |
| 6 | 1 | -1 | -1 | 1 | 0,05842 |
| 7 | 1 | -1 | 1 | -1 | 0,04709 |
| 8 | 1 | -1 | -1 | -1 | 0,05831 |
| 9 | -1 | 1 | 1 | 1 | 0,04754 |
| 10 | -1 | 1 | -1 | 1 | 0,05570 |
| 11 | -1 | 1 | 1 | -1 | 0,04554 |
| 12 | -1 | 1 | -1 | -1 | 0,04997 |
| 13 | -1 | -1 | 1 | 1 | 0,05336 |
| 14 | -1 | -1 | -1 | 1 | 0,06398 |
| 15 | -1 | -1 | 1 | -1 | 0,05021 |
| 16 | -1 | -1 | -1 | -1 | 0,05827 |
| 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,05759 |
| 18 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,06302 |
| 19 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,04963 |
| 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,05966 |

Após a análise de resultados, obteve-se os gráficos na Figura 21 com o qual não se observou mudança significativa do padrão de resposta quando em uma taxa de variação de 5% para mais ou para menos, indicando um método robusto nessa faixa.

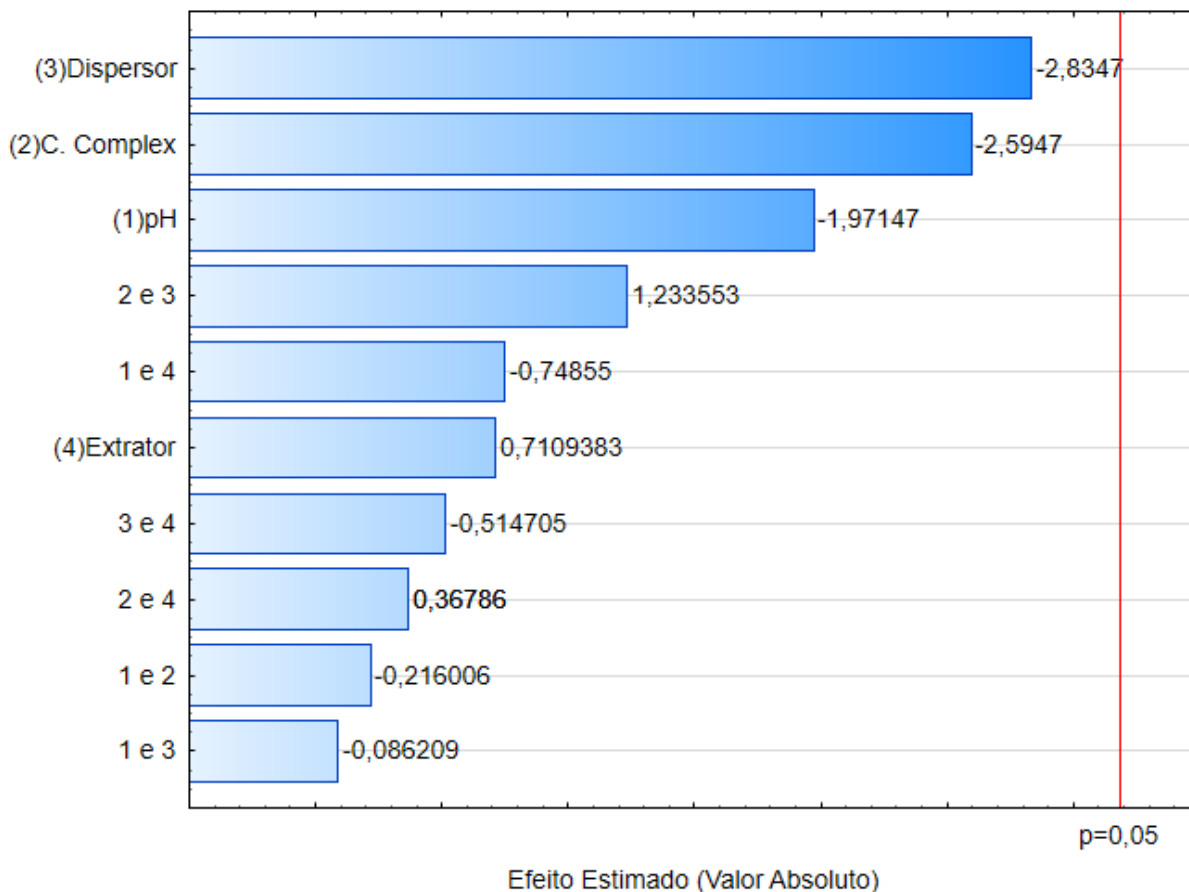


Figura 21: Gráfico de Pareto para o Teste de Robustez

5.1.4.6 Análise de Interferentes

É considerado interferente, uma espécie química que afeta significativamente o sinal analítico das medidas realizadas. Foi avaliada a interferência de Cu, Fe, Pb, Ni e Zn. Para o teste foram variadas as concentrações dos metais potencialmente interferentes em $10 \mu\text{g L}^{-1}$, sendo $10 \mu\text{g L}^{-1}$, $20 \mu\text{g L}^{-1}$, $30 \mu\text{g L}^{-1}$, $40 \mu\text{g L}^{-1}$ e $50 \mu\text{g L}^{-1}$. Os resultados estão representados na Tabela 10.

De acordo com a análise não houve interferência significativa dado pelo teste t, com intervalo de confiança de 95%, o que mostra que até as concentrações estudadas, o método é sensível para a determinação do cádmio.

Tabela 10: Resultado da análise de interferentes para o cádmio

| Metal | Variação da Concentração do metal interferente | | | | |
|-----------|--|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | 10 µg L ⁻¹ | 20 µg L ⁻¹ | 30 µg L ⁻¹ | 40 µg L ⁻¹ | 50 µg L ⁻¹ |
| Cu | 60,40 ± 0,22 | 59,64 ± 0,19 | 60,59 ± 0,23 | 60,91 ± 0,32 | 61,45 ± 0,28 |
| Fe | 60,00 ± 0,66 | 60,82 ± 0,35 | 72,78 ± 0,28 | 59,55 ± 0,24 | 60,70 ± 0,26 |
| Pb | 60,84 ± 0,72 | 61,40 ± 0,43 | 60,91 ± 0,22 | 60,88 ± 0,42 | 60,97 ± 0,26 |
| Ni | 60,81 ± 0,23 | 60,62 ± 0,76 | 61,23 ± 0,54 | 60,07 ± 0,29 | 60,24 ± 0,24 |
| Zn | 59,49 ± 0,28 | 60,92 ± 0,22 | 60,73 ± 0,27 | 60,73 ± 0,23 | 60,00 ± 0,29 |

5.1.4.7 Teste de Recuperação

Um método apresenta boa exatidão quando apresenta resultados concordantes com aqueles que são certificados. A exatidão de um método pode ser avaliada através da realização da medida de materiais de referência certificados, através da comparação com resultados de medidas realizadas por um método validado ou por testes de adição e recuperação de quantidades conhecidas do analito na matriz.

Neste trabalho foi realizado um teste de recuperação, que visa adicionar uma determinada quantidade de analito à amostra original e realizar a determinação pelo método proposto. O valor de recuperação deve coincidir com o valor teórico calculado (quantidade de analito encontrada na amostra sem a adição mais o adicionado), com o determinado pelo método após a adição. Dessa forma é possível calcular uma porcentagem de recuperação que não deve ultrapassar 5%, para mais ou para menos. Foram selecionadas amostras de 5 cidades aleatórias dentro das estudadas e avaliado o teor de recuperação. A escolha do valor de e 50 µg L⁻¹ se deu por este ser a metade do valor máximo da curva de linearidade.

Pela análise realizada, a taxa de recuperação apresentou-se dentro da faixa ideal, com uma média de 98,3% (± 0,36). Os valores estão expressos na Tabela 11.

Tabela 11: Resultados para o teste de recuperação com adição de analito à amostra

| Cidade | Cd Adicionado* | Cd Encontrado* | Porcentagem de Recuperação (%) |
|---------------|-----------------------|-----------------------|---------------------------------------|
| BAR | 0,00 | 14,69 | --- |
| | 50,00 | 63,63 | 98,37 ± 0,23 |
| EUN | 0,00 | 13,90 | --- |
| | 50,00 | 62,85 | 98,35 ± 0,80 |
| FEI | 0,00 | 15,16 | --- |
| | 50,00 | 64,10 | 98,38 ± 0,32 |
| GUA | 0,00 | 18,79 | --- |
| | 50,00 | 67,73 | 98,47 ± 0,97 |
| RIB | 0,00 | 17,98 | --- |
| | 50,00 | 66,93 | 98,45 ± 0,53 |
| SAL | 0,00 | 14,11 | --- |
| | 50,00 | 63,06 | 98,36 ± 0,28 |

* valores expressos em concentração de Cd na amostra digerida (em µg L⁻¹);

Legenda: BAR: Barreiras; EUN: Eunápolis; FEI: Feira de Santana; GUA: Guanambi; RIB: Ribeirão do Largo; SAL: Salvador.

5.1.5 Aplicação do método

Após as etapas de desenvolvimento e validação do método, realizou-se a aplicação do método às amostras oriundas das 15 cidades selecionadas pelo estudo. Como a alface é um alimento ingerido cru com alto teor de umidade (97% de umidade ± 2%) o peso está escrito em mg por Kg de peso seco e em mg por Kg de alimento *in natura*. Os valores obtidos estão dispostos na Tabela 12.

Tabela 12: Resultado da aplicação do método proposto para as amostras de Alface proveniente das 15 cidades estudadas

| Amostra | Concentração por alimento seco (mg Kg ⁻¹ peso seco) | | Concentração por alimento “ <i>In Natura</i> ” (mg Kg ⁻¹ peso hidratado) | |
|---------|--|---------------|---|---------------|
| | Média | Desvio Padrão | Média | Desvio Padrão |
| BRU | 0,00509 | 0,00257 | 0,00015 | 0,00008 |
| CAE | 0,00756 | 0,00141 | 0,00023 | 0,00004 |
| CAC | 0,00256 | 0,00105 | 0,00008 | 0,00003 |
| RIA | 0,00559 | 0,00107 | 0,00017 | 0,00003 |
| CAN | 0,00719 | 0,00072 | 0,00022 | 0,00002 |
| MAL | 0,02424 | 0,01193 | 0,00073 | 0,00036 |
| BOQ | 0,01130 | 0,00349 | 0,00034 | 0,00010 |
| MAC | 0,01839 | 0,00078 | 0,00055 | 0,00002 |
| VIT | 0,02053 | 0,00312 | 0,00062 | 0,00009 |
| BAR | 0,01433 | 0,00009 | 0,00043 | 0,00000 |
| EUN | 0,01353 | 0,00009 | 0,00041 | 0,00000 |
| FEI | 0,01430 | 0,00035 | 0,00043 | 0,00001 |
| GUA | 0,01858 | 0,00028 | 0,00056 | 0,00001 |
| RIB | 0,01765 | 0,00012 | 0,00053 | 0,00000 |
| SAL | 0,01346 | 0,00025 | 0,00040 | 0,00001 |

Legenda: BRU: Brumado; CAE: Caetité; CAC: Caculé; RIA: Riacho de Santana; CAN: Candiba; MAL: Malhada de Pedras; BOQ: Boquira; MAC: Macaúbas; VIT: Vitória da Conquista; BAR: Barreiras; EUN: Eunápolis; FEI: Feira de Santana; GUA: Guanambi; RIB: Ribeirão do Largo; SAL: Salvador.

5.2 Determinação direta de macronutrientes em alface

Para complementar o estudo da composição de minerais na alface foi aplicada duas técnicas de análise exploratória de dados, a PCA e a HCA já descritas anteriormente. Para isso foi dosado o teor de Zn, Mg, Ca, Cu e Fe, por leitura direta no F AAS. Os resultados estão expostos na Tabela 13. Os teores de Fe

apresentaram valores abaixo do limite de detecção do aparelho não sendo, portanto, considerados na análise.

Tabela 13: Resultados da composição mineral da alface para as amostras das cidades do estudo

| Cidades | Zn* | Mg* | Ca* | Cu* | Cd* | Fe* |
|----------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| EUN | 96,120 | 2342,088 | 12866,464 | 107,589 | 0,014 | <LD |
| RIB | 70,758 | 2240,606 | 5327,938 | 101,340 | 0,018 | <LD |
| MAC | 66,767 | 2697,278 | 19800,708 | 88,034 | 0,018 | <LD |
| GUA | 48,730 | 2837,233 | 14793,374 | 115,356 | 0,019 | <LD |
| CAC | 48,545 | 2749,267 | 13689,428 | 114,991 | 0,003 | <LD |
| CAN | 73,165 | 3429,492 | 4788,906 | 98,681 | 0,007 | <LD |
| VIT | 105,352 | 1932,934 | 3370,595 | 90,975 | 0,021 | <LD |
| FEI | 81,778 | 3227,567 | 18898,668 | 86,214 | 0,014 | <LD |
| SAL | 97,241 | 2320,877 | 12752,487 | 88,680 | 0,013 | <LD |
| BAR | 94,546 | 2271,383 | 13873,883 | 76,659 | 0,014 | <LD |
| MAL | 66,302 | 2683,761 | 6302,597 | 78,917 | 0,024 | <LD |
| RIA | 38,181 | 3143,968 | 15216,995 | 67,565 | 0,006 | <LD |
| BOQ | 127,565 | 3419,926 | 12266,060 | 73,735 | 0,011 | <LD |
| CAE | 118,037 | 3207,603 | 18386,107 | 71,435 | 0,008 | <LD |
| BRU | 91,800 | 3413,688 | 13878,907 | 61,365 | 0,005 | <LD |

* valores expressos em mg Kg⁻¹ de peso seco do alimento.

Legenda: BRU: Brumado; CAE: Caetité; CAC: Caculé; RIA: Riacho de Santana; CAN: Candiba; MAL: Malhada de Pedras; BOQ: Boquirá; MAC: Macaúbas; VIT: Vitória da Conquista; BAR: Barreiras; EUN: Eunápolis; FEI: Feira de Santana; GUA: Guanambi; RIB: Ribeirão do Largo; SAL: Salvador.

Limites de detecção e de quantificação: Zn (LD: 0,003 mg Kg⁻¹ e LQ: 0,11 mg Kg⁻¹); Mg (LD: 0,004 mg Kg⁻¹ e LQ: 0,13 mg Kg⁻¹); Ca (LD 0,069 mg Kg⁻¹ e LQ: 0,23 mg Kg⁻¹) Cu (LD: 0,01 mg Kg⁻¹ e LQ: 0,61 mg Kg⁻¹) Cd (0,00061 mg Kg⁻¹ e LQ 0,00203 mg Kg⁻¹) e Fe (0,057 mg Kg⁻¹ e LQ 0,19 mg Kg⁻¹).

5.2.1 Análise de Componentes Principais (PCA)

A PCA foi aplicada aos resultados obtidos após a análise de 15 amostras de alface envolvendo 5 variáveis (Ca, Cd, Cu, Mn e Zn), sob os dados auto-escalados. O primeiro passo após a análise foi escolher o número de componentes principais PC's. Os componentes principais são novos eixos criados a partir das variáveis iniciais. Para este trabalho foram escolhidos as três primeiras PC's porque juntas elas acumulam 81,43% da variância total. A Tabela 14 apresenta os dados sobre a variância acumulada. Sendo assim, foi possível reduzir a dimensionalidade da matriz original dos dados de 4 (4 variáveis/dimensões) para 3 (3 PC). A componente principal residual explica apenas 18,57% da variância dos dados originais.

A Tabela 14 também apresenta o peso das variáveis para cada componente principal. As variáveis com maiores pesos em PC1 e em PC2 foram destacadas em negrito. Observa-se que as variáveis dominantes em PC1 são Mg, Cu e Cd para PC2 a variável dominante é Zn e para PC3 a variável dominante é Ca.

O resultado da Análise de Componentes Principais é apresentado nas Figura 22, Figura 23, Figura 24 e Figura 25 nos gráficos de pesos e escores para PC1 x PC2 e PC1 X PC3.

Tabela 14: Variância acumulada

| Variáveis | PC 1 | PC 2 | PC 3 |
|--------------------------------|------------------|-----------------|-----------------|
| Zn | 0,164523 | 0,871442 | -0,026202 |
| Mg | 0,842549 | -0,159242 | -0,232109 |
| Ca | 0,617428 | -0,224671 | 0,734607 |
| Cu | -0,620756 | -0,586010 | -0,048763 |
| Cd | -0,737373 | 0,317687 | 0,385100 |
| Variância Total (%) | 40,94 | 25,59 | 14,90 |
| Variância Acumulada (%) | 40,94 | 66,54 | 81,43 |

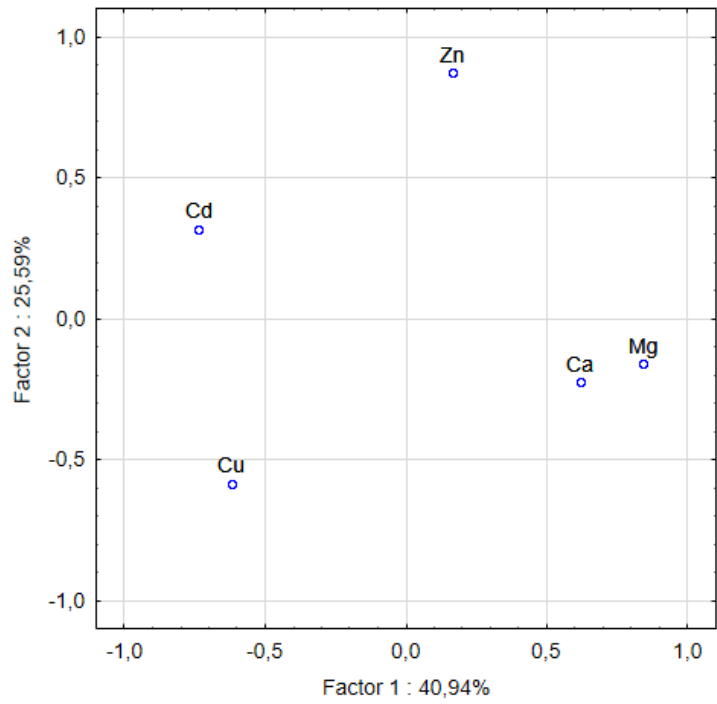


Figura 22: Gráfico de pesos PC1 xPC2

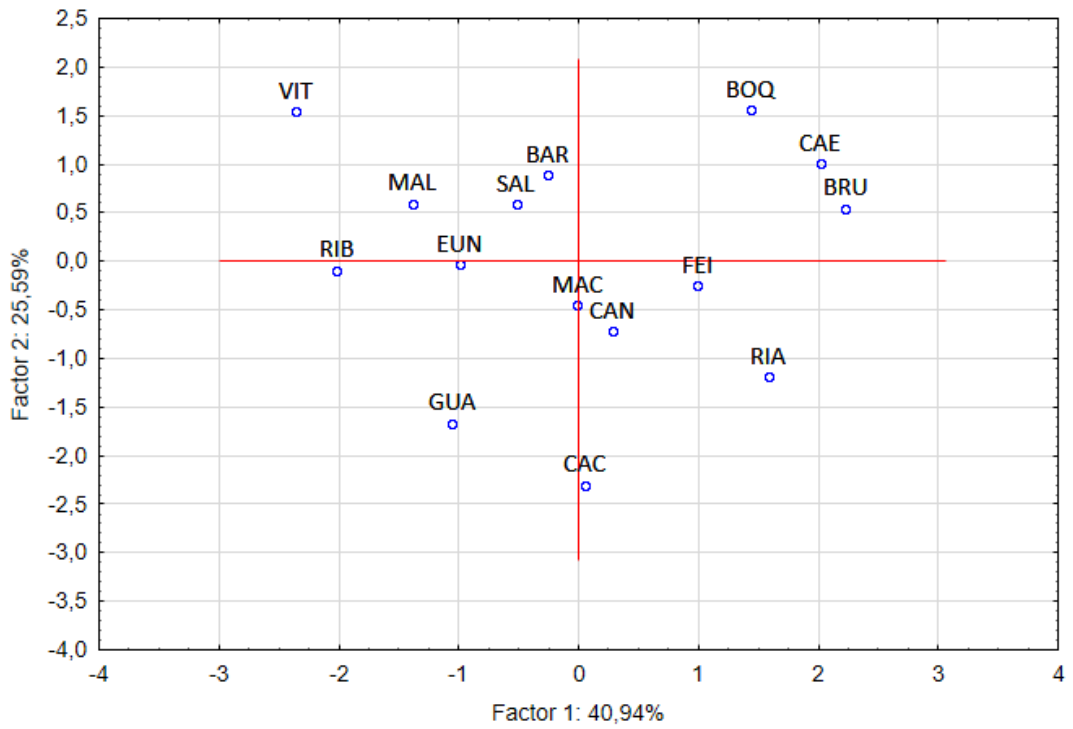


Figura 23: Gráfico de escores PC1 xPC2.

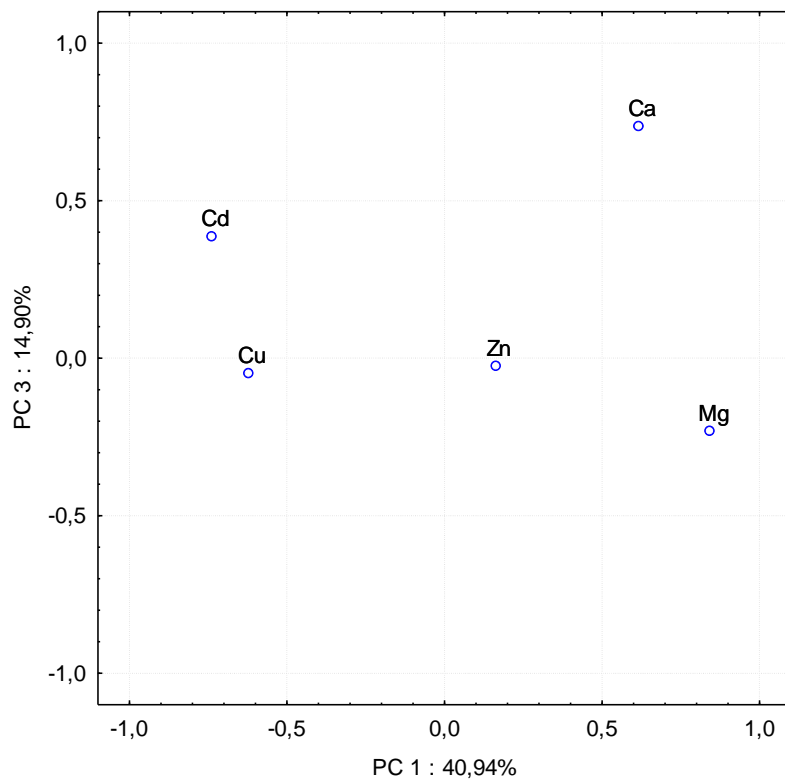


Figura 24: Gráfico de Pesos para PC1 x PC3

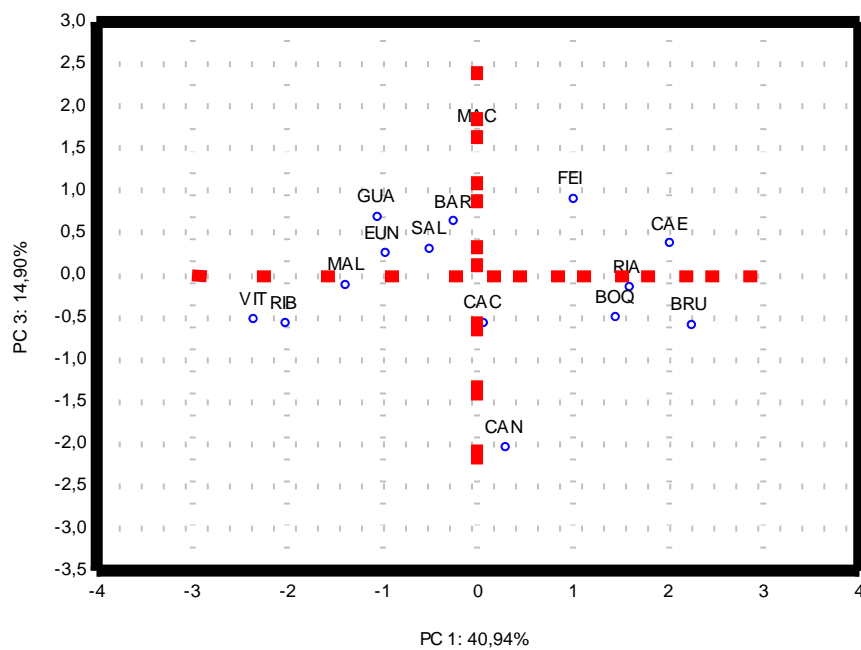


Figura 25: Gráfico de escores para PC1 x PC3

5.2.2 Análise de agrupamento hierárquico (HCA)

A fim de avaliar os resultados obtidos pela PCA, realizou-se uma Análise de Agrupamento Hierárquico. A análise foi aplicada aos dados auto-escalados. A distância Euclidiana foi usada para calcular a similaridade entre as amostras. O método de ligação usado foi o método de Ward. O dendograma obtido é apresentado na figura 26.

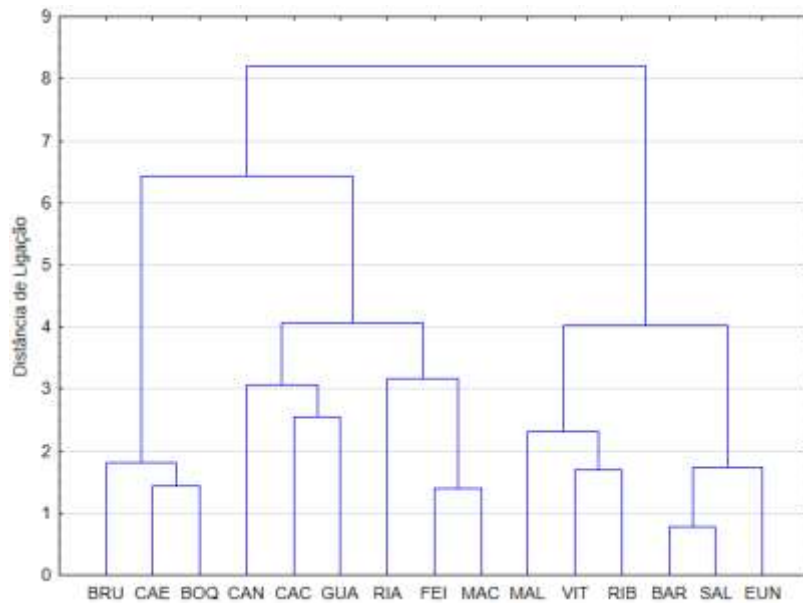


Figura 26: Gráfico de HCA que revela a distância entre as amostras de diferentes cidades estudadas

6. Discussão

6.1 Desenvolvimento do método

O desenvolvimento do método utilizando o planejamento fatorial de 2 níveis e a otimização com o desenho de Box-Behnken revela uma alternativa bastante eficaz para se saber as condições ótimas, uma vez que após identificar as variáveis que interferiam na resposta foi possível quantificar qual o ponto exato para as condições propostas no estudo. Há de se ressaltar também a importância da análise univariada realizada previamente, com o objetivo de conhecer o novo sistema.

6.1.1 Etapa prévia ao desenvolvimento do método: Planejamento Univariado

Pelo estudo do planejamento univariado apresentado no item 5.1.1, observou-se que o sistema se comporta de maneira inversamente proporcional quando comparados a concentração do complexante utilizado e o volume do extrator. Basicamente, se elevarmos a concentração do complexante a resposta tende a aumentar e se diminuirmos a quantidade de extrator a resposta também se eleva (fato que será comprovado pela análise multivariada, discutida nos itens seguintes). Um fator a ser observado também é que se diminuirmos o valor do extrator a valores abaixo de 30 μL , a resposta tende a se estabilizar, mesmo se o metal estiver em maior concentração no meio. Isso explica-se que em valores muito baixos do referido, pode não haver solução extratora suficiente para todo sistema.

6.1.2 Estudo do efeito do volume dos solventes extrator e dispersor

Algo importante a se considerar é que o volume da gota do extrator tendeu para o nível inferior como pode ser observado no gráfico de Pareto (Figura 12), uma vez que volumes maiores dificultando a retirada da gota que poderia ser “perdida” durante o processo de retirada da gota e assim levando consigo alguma quantidade do analito. Volumes muito grandes do extrator geram uma gota grande que é difícil de ser retirada pelo analista. Outro fator a se considerar pela técnica é que a

experiência do pesquisador com relação à retirada da fase extratora será de suma importância, onde pessoas não treinadas tendem a não considerar pequenas fragmentações da fase original, mas que podem conter grande quantidade de analito, diminuindo a resposta observada.

Para o método o volume otimizado de 0,036 mL se mostrou bem praticável para a extração da gota. Behbahani *et al* (2014) ao determinar o cádmio em amostras de água utilizou 50 µL de agente extrator (1-octanol) e 500 µL de agente dispersor, para um volume total de 10 mL. Kocúrová *et al* (2013) utilizou 0,5 mL de uma mistura de tolueno e fosfato de tributila 4:1 (v/v), em um volume final de 10 mL. Por fim, a DLLME também foi utilizada para a determinação do cádmio utilizando clorofórmio, onde foram utilizadas na mistura com etanol 100 µL do extrator para um volume final de 15 mL (WEN *et al*, 2011).

Tudo isso comprova a aplicabilidade da utilização de menores volumes para a extração, além de estar condizentes com os princípios da química verde, pois o presente trabalho cumpre o seu papel em extrair e determinar o cádmio reduzindo a quantidade de reagentes orgânicos, grande problema em processos analíticos pela grande geração de resíduos. A química verde se pauta no princípio da sustentabilidade em procedimentos educacionais e comerciais e, por consequência, trabalhos que ajudem a reduzir esse lançamento de resíduos são extremamente válidos (COLLINS, 2015).

O volume adicionado do dispersor também foi avaliado, mas não se apresentou significativo ao final do planejamento, sendo retirado da análise de otimização para reduzir a quantidade de experimentos, e fixado no menor volume estudado (0,800 mL) a fim de se reduzir a quantidade de reagente empregada no processo. Novamente grandes volumes de dispersor (acima de 2,5 mL para um volume final de 8,00 mL) tenderia a formar também uma emulsão com o extrator, impossibilitando, mais uma vez, a realização do método.

6.1.3 Estudo do efeito do pH

Com relação ao pH, o estudo mostrou uma tendência positiva para o aumento da resposta quando se aumentava o valor deste. Isso está relacionado com o fato de o cádmio, por ser um elemento de raio atômico grande e número de coordenação 6

“necessitar” de complexantes que possuam 6 ligações de coordenação disponíveis e que estejam completamente desprotonados, fato que ocorrerá em ambientes com pH mais básico (SKOOG, 2006; HARRIS, 2005). Dessa forma, para a ligação com o agente complexante utilizado (5-Br-PADAP) o valor ótimo ficou na faixa de pH de 10,88. Essa probabilidade também foi observada por outros autores (ROJAS *et al*, 2011; JAFARVAND e SHEMIRANI, 2011). Já a concentração do complexante não revelou interferência na análise para a faixa estudada (apenas apresentando uma tendência para a utilização de maiores valores de concentração), porém esta informação deve ser vista com cuidado, uma vez que grandes quantidades de complexante adicionado (acima de $1,0 \times 10^{-2}$ % (m/v) tenderia a formar uma microemulsão com o extrator, impossibilitando o método (a gota se “dissolve”).

De acordo com os resultados alcançados o método se mostrou uma alternativa viável para a pré-concentração do cádmio em amostras de alface. O método se mostrou confiável após todos os parâmetros de certificação realizados.

6.2 Parâmetros de certificação do método

O método foi certificado utilizando as figuras de mérito: Limite de Detecção (LD), Limite de Quantificação (LQ), Linearidade, Fator de Enriquecimento, Precisão, Recuperação, Análise de Interferentes e Robustez.

6.2.1 Limites de Detecção e Quantificação

Foram encontrados baixos limites de detecção e quantificação (LD 0,610 µg/L e LQ 2,032 µg/L) que está condizente com valores encontrados em outros trabalhos, como é o caso de Behbahani *et al* (2014) (LD 0,03 µL) e Kocúrová *et al* (2013) (LD 0,007 mg/Kg), bem abaixo do encontrado por Santos *et al* (2015) (LD 34 µg/L e LQ 115 µg/L) e bem superior ao encontrado por López-García *et al* (2014) (LD de 10 ng/kg) e por Es'haghi *et al* (2013) (12 ng/L), contudo a análise destes últimos foram realizados em GF AAS, técnica de maior sensibilidade do que a usada no presente estudo.

6.2.2 Linearidade

Outro parâmetro bastante importante é a linearidade do método, pois é necessário observar, com base nas variáveis otimizadas, se é possível construir uma curva de calibração e se ela se mantém aplicável. No estudo, observou-se que a curva apresentou um coeficiente de determinação, R^2 , de 0,997, indicando que é possível quantificar o teor de cádmio pela equação da curva apresentada:

Equação 4: $y = -0,0064x + 0,0015$

Onde y representa o valor de absorvância (sinal analítico apresentado pelo equipamento e o x representa o valor da concentração). O valor de R^2 deve sempre permanecer acima de 0,997, para que o mínimo de confiança seja depositado no cálculo pela equação apresentada (SKOOG, 2006; HARRIS, 2005).

6.2.3 Fator de Enriquecimento

Ainda com base na curva apresentada foi calculado o fator de enriquecimento. Esse valor representa uma aproximação do valor “real” que deveria ser calculado com base na equação:

Equação 5: $FE = \frac{C_f}{C_i}$

onde C_f é a concentração do analito no pré-concentrado e C_i é a concentração original na amostra. Mas que é pouco praticado pelos trabalhos de desenvolvimento. Utilizando-se as inclinações, é possível observar o aumento das respostas do equipamento e não da concentração real, devendo, portanto, garantir que condições inerentes ao processo de análise como sinal analítico, detector do equipamento e condições de avaliador se mantenham os mesmos para ambas as curvas determinadas. Uma alternativa, além de se observar o grau de confiança do próprio equipamento é a realização das análises de ambos os processos no mesmo instante (FANG, 1993). No estudo o FE foi de 13,58. Este fator está abaixo dos encontrados pela maioria dos estudos que utilizam a DLLME foi de 100 a 165 vezes (LOPÉZ-

GARCÍA *et al*, 2014; BEHBAHANI *et al*, 2014; SANTOS, *et al*, 2015; ES'HAGHI *et al*, 2013).

6.2.4 Precisão

A precisão calculada para o método proposto levou como base a repetição de pontos de concentração definida com sua posterior quantificação na curva de calibração. Como o objetivo é que elas se apresentem com o mesmo valor após o cálculo é necessário a determinação do valor de desvio padrão relativo (RSD) e que este seja baixo. Para os pontos quantificados se observou um RSD de 8,69% para o ponto de 20 µg/L e de 4,86% para o ponto de 100 µg/L, que se mostrou levemente superior ao apresentado por outros autores: 2,6% (WEN *et al*, 2011), 4,82% (ES'HAGHI *et al*, 2013), 2,8-5,0% (KOCÚROVÁ *et al*, 2013) e 4,0 % (LOPÉZ-GARCÍA *et al*, 2014).

6.2.5 Exatidão

A exatidão do método foi o último parâmetro utilizado na validação. Conforme está apresentado na Tabela 11, a taxa de recuperação para a análise nas amostras selecionadas ficou próximo a 98%. Alguns trabalhos que utilizam a DLLME para o cádmio encontraram valores parecidos, como 98 ± 5% (LOPÉZ-GARCÍA *et al*, 2014) e de 103 ± 4% (SANTOS *et al*, 2015).

6.2.6 Análise de interferentes

Também foi realizado um teste para avaliação da interferência de alguns íons frente ao método. Como dito anteriormente, cádmio, zinco e demais metais pesados tendem a se acumular em tecidos orgânicos, principalmente por possuírem características químicas parecidas, como raio atômico e elevada massa atômica (SBARTAI *et al*, 2012; SKOOG, 2006). Dessa forma, esses íons poderiam diminuir a resposta do cádmio por se ligarem ao complexante ao invés do analito. Contudo, não foi observada interferência significativa, como indicada pelo teste T aos resultados da Tabela 10. Sendo assim, não se fez necessário a adição de agentes

complexantes auxiliares, o que reduziu o tempo de análise bem como a utilização de reagentes químicos em excesso.

6.2.7 Robustez

Para se avaliar a robustez do método se realizou um novo desenho de planejamento fatorial de 2 níveis, só que adicionando pequenas variações (da ordem de 5% para mais e para menos) para os valores já otimizados. Pelo planejamento, nenhuma das condições apresentou variação significativa, indicando que o método é robusto, ou seja, pequenas variações tendem a não alterar o resultado da análise, seja pelo pH, concentração do complexante, volume da gota extratora e volume do agente dispersor.

6.3 Aplicação do método

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 12, percebe-se que nenhuma das amostras continha quantidades significativas do metal, se analisarmos o seu potencial tóxico. Os resultados foram apresentados levando em consideração o peso seco, obtidos após a etapa de desidratação descritas no item 4.4, cujo teor de umidade foi calculado com base no princípio: $(A/A-B) \times 100$, onde A representa o peso da amostra *in natura*, B representa o peso da amostra seca. O teor médio de desidratação foi de $97\% \pm 2\%$. Os valores também foram mostrados para o alimento "*in natura*", ou seja, da maneira em que é consumido. Se compararmos com o valor descrito na legislação brasileira - ANVISA (BRASIL, 2013) este valor está bem abaixo do máximo permitido (0,05 mg/ Kg de alimento comestível) para as hortaliças, indicando que muito provavelmente não houve bioacumulação do cádmio nas amostras analisadas.

A Tabela Brasileira de Composição de Alimentos, uma referência utilizada pelos serviços de nutrição e dietética para cálculo e prescrição de alimentos aos seus pacientes/clientes, não traz valores referentes à quantidade de cádmio em amostras de alimentos por considerar este um contaminante que não deve estar presente em alimentos para que o conceito de alimentação saudável se mantenha (UNICAMP, 2011). O mesmo princípio é seguido pela Tabela de Composição de

Nutrientes da USDA (*United States Department of Agriculture*), um padrão norte-americano (USDA, 2015).

Ao observar os trabalhos voltados à análise do cádmio em alimentos, é encontrado principalmente a avaliação do potencial de acumulação em ensaios controlados, como já dito anteriormente. É o caso, por exemplo de solos tratados com adição de cádmio e que podem chegar à níveis de $1,11 \text{ mg Kg}^{-1}$ de alimento após 76 dias de exposição da planta ao solo contaminado, o que representaria um grande risco à saúde (LI *et al*, 2015).

Diante disso, ao final do desenvolvimento e validação, o método proposto se mostrou bastante confiável e uma boa alternativa para a determinação do cádmio nas amostras de alface.

6.4 Análise exploratória dos dados

Como adendo ao desenvolvimento do método, foi realizada a análise exploratória dos dados (que incluíram as quantificações de Zn, Cu, Mg, Ca e Fe – além do Cd) para traçar um perfil da distribuição mineral nas amostras coletadas. Pelo fato de o Fe apresentar valores abaixo do limite de detecção do aparelho pela determinação direta (sem pré-concentração) ele foi excluído do cálculo da análise.

6.4.1 Análise de componentes principais (PCA)

Depois dos resultados obtidos e apresentados no item 5.2.1 prosseguiu-se com a análise dos gráficos gerados pela PCA. Observando-se o gráfico de escores mostrado na Figura 23, não é possível visualizar a formação de grupos, contudo observa-se uma separação entre as amostras. Verifica-se que as amostras de VIT, RIB, MAL, EUN, GUA, SAL, BAR separam-se das amostras BRU, CAE, BOQ, RIA, FEI e CAN. Avaliando conjuntamente o gráfico de escores e o gráfico de pesos (Figura 22) é possível entender quais as variáveis estão influenciando a separação entre as amostras. Observa-se que as amostras de VIT, RIB, MAL, EUN, GUA, SAL, BAR estão posicionadas no eixo negativo de PC1, enquanto que as demais amostras BRU, CAE, BOQ, RIA, FEI e CAN estão deslocadas para o eixo positivo de PC1 no gráfico de escores.

Analisando-se o mesmo gráfico de pesos segundo o eixo de PC1 observa-se que as variáveis que possuem pesos elevados no eixo negativo de PC1 são Cd e Cu e no eixo positivo Mg está no eixo positivo de PC1. Dessa forma, pode-se concluir que as amostras de VIT, RIB, MAL, EUN, GUA, SAL, BAR possuem maiores concentrações Cu e Cd e, principalmente, cádmio porque este elemento possui o maior peso dentre eles. Em contrapartida, as amostras de alface destas cidades possuem menores concentrações de Mg e Ca que as demais amostras. Em compensação as amostras de BRU, CAE, BOQ, RIA, FEI e CAN possuem maiores concentrações de Mg e Ca e baixas de Cu e Cd.

Avaliando-se o gráfico de escores segundo o eixo de PC2 observa-se que o Zn é a variável de maior peso positivo e, portanto, consegue discriminar as amostras segundo a concentração deste metal. Dessa forma, é possível fazer uma observação que a PC1 não permite, ou seja, verificar a separação da amostra CAC que está localizada no eixo negativo de PC2. Além da amostra CAC, as amostras GUA, RIA e CAN também se separam das amostras VIT, MAL, SAL, BAR, BOQ, CAE e BRU, sendo que estas últimas possuem elevadas concentrações de Zn, enquanto as primeiras possuem baixas concentrações do metal. A amostra MAC não é distinguível das demais amostras analisando PC1 x PC2, só é possível verificar alguma separação quando é plotado o gráfico de escores PC1 X PC3 (Figura 25). O cálcio é a variável de maior peso em PC3 (Figura 24) e também responsável pela separação da amostra MAC.

6.4.2 Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA)

A partir da análise do dendograma (Figura 26) observou-se que a Análise de Agrupamento Hierárquico corrobora com os resultados obtidos para a Análise de Componentes Principais. Se atribuímos um corte à distância de ligação de 7 observamos que existem 2 grupos: um formado pelas amostras de BRU, CAE, BOQCAN, CAC, GUA RIA, FEI e MAC, um segundo grupo pelas amostras MAL, VIT, RIB, BAR, SAL e EUN, reforçando as conclusões geradas à partir da PCA.

7. Conclusão

Um desenvolvimento de método para análise química envolve uma série de fatores que vão desde os parâmetros de certificação à preocupação com a redução de substâncias químicas empregadas.

Além disso, o cádmio por ser classificado como um metal pesado e conseqüentemente seu grau de toxicidade, requer o desenvolvimento de métodos cada vez mais sensíveis, uma vez que os níveis permitidos são muito baixos (da ordem de $\mu\text{g Kg}^{-1}$).

A industrialização, bem como a falta de controle de qualidade no processo produtivo, pode levar à acumulação na planta e aumentar o potencial risco ao ser humano.

No presente estudo a determinação do cádmio pela microextração líquido-líquido por gota dispersiva (DLLME) se mostrou efetiva e uma alternativa bastante viável para extração e posterior quantificação do metal em alimentos sólidos, como é o caso da alface. Aos parâmetros estudados, o método se mostrou preciso, robusto, reprodutivo e com baixos valores para LD e LQ.

Quanto aos resultados, não foram encontradas grandes quantidades de cádmio nas amostras quantificadas e, se comparando com os valores máximos permitidos pela legislação brasileira, todas as amostras se mostraram seguras do ponto de vista toxicológico para o cádmio. Contudo, se faz necessário a realização de novos experimentos para que se traça o perfil toxicológico, principalmente ao incluir determinações de outros metais tóxicos, como Pb, Ni, Hg, As e Cr.

Pelo perfil mineral traçado nas amostras, evidenciado pela PCA e HCA, não foram encontradas grandes diferenças entre os teores de minerais entre as amostras coletadas nas diferentes cidades.

8. Referências

ABADI, M. D. M. et al. Na overview of liquid phase microextraction approaches combined with UV–Vis spectrophotometry. **Talanta**. v.99, p.1–12, 2012.

ADRIANO, D. C. **Trace Elements in Terrestrial Enviroments: Biogeochemistry, Bioavailability, and Risks of Metals**. 2 ed. New York: Springer, 2001.

ALMEIDA, J.S. et al. Ultrasound-assisted single-drop microextraction for the determination of cadmium in vegetable oils using high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta**. Part B, v.107, p.159–163, 2015.

BAHAR, S.; ZAKERIAN, R. Determination of Copper in Human Hair and Tea Samples after Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Based on Solidification of Floating Organic Drop (DLLME-SFO). **J. Braz. Chem. Soc.**, v.23, n.6, p.1166-1173, 2012.

BAHAR, S.; ZAKERIAN, R. Speciation of Fe(II) and Fe(III) by using Dispersive Liquid-Liquid Microextraction and Flame Atomic Absorption Spectrometry. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.23, n.5, p.944-950, 2012b.

BEEBE, K. R. **Chemometrics: a practical guide**. 1ed. New York: Jhon Wiley & Sons, 1998.

BEHBAHANI, M. et al. Modified nanoporous carbon as a novel sorbent before solvent-based de-emulsification dispersive liquid–liquid microextraction for ultra-trace detection of cadmium by flame atomic absorption spectrophotometry. **Measurement**. v.51, p.174–181, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Guia alimentar para a população brasileira: promovendo a alimentação saudável**. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº42. Dispõe sobre o regulamento técnico MERCOSUL sobre limites máximos de contaminantes Inorgânicos em Alimentos. **Publicado no Diário Oficial da União no dia 30 de Agosto de 2013**. Brasília, DF, 2013.

BRERETON, R.G. **Applied Chemometrics for Scientists**. New York: Jhon Willey & Sons, 2007.

BOX, G. E. P.; BEHNKEN, D. W. Some New three level designs for the study of quantitative variables. **Technometrics**. v.2, n.4, p.455-475, 1960.

CECÍLIO FILHO, A. B.; MAY, A. Produtividade das culturas de alface e rabanete em função da época de estabelecimento do consórcio. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 3, p. 501-504, setembro 2002.

CHANG, K. C., et al. Cadmium Induces Apoptosis in Pancreatic β -Cells through a Mitochondria-Dependent Pathway: The Role of Oxidative Stress-Mediated c-Jun N-Terminal Kinase Activation. **PLoS ONE**, v.8, n.2, 2013.

CHUANG, J C. JONES, P A. Epigenetics and MicroRNAs. **Pedriatric Research**. v.61, n.5, p. 24-29, 2007.

COLLINS, T. J. Review of the twenty-three year evolution of the first university course in green chemistry: teaching future leaders how to create sustainable societies. **Journal of Cleaner Production**, 2015.

CORREIA, P. R. M.; FERREIRA, M. M. C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Quim. Nova**, v.30, n.2, p.481-487, 2007.

DENG, H.; YE, Z.H.; WONG, M.H. Accumulation of lead, zinc, copper and cadmium by 12 wetland plant species thriving in metal-contaminated sites in China.

Environmental Pollution, v., n.132, p.29-40, 2004.

DEMING, S. N.; MORGAN, S. L. **Experimental design: a chemometric approach**. 1ed. Vol.3. New York: Elsevier, 1987.

DUARTE, R. P.; DUARTE, S.; PASQUAL, Antenor. Avaliação do Cádmio (Cd), Chumbo (Pb), Níquel (Ni) e Zinco (Zn) em solos, plantas e cabelos humanos.

Energia na Agricultura, vol. 15, n. 1, 2000.

DUFFUS, J.H. Heavy metals - A meaningless term?. **Pure and Applied Chemistry**. v. 74, n. 5, p. 793-807, 2002.

ES'HAGHI, Z. et al. Pseudo-stir bar hollow fiber solid/liquid phase microextraction combined with anodic stripping voltammetry for determination of lead and cadmium in water samples. **Journal of Advanced Research**. 2013.

FANG, Z. **Flow Injection Separation and Preconcentration**. New York: VCH. 1993.

GO, Y. M.; ORR, M.; JONES, D.P. Actin cytoskeleton redox proteome oxidation by cadmium. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**. v.1, n.305, p.L831–L843, 2013.

GUYTON, Arthur C.; HALL, John E. **Fisiologia humana e mecanismos das doenças**. 6.ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 1998.

HARRIS, Daniel C. Análise química quantitativa. 6ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005.

HENZ, G. P.; SUINAGA, F. **Tipos de alface cultivados no Brasil**. Comunicado Técnico 75, Embrapa Hortaliças, Brasília, novembro, 2009

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agropecuário 2006**. Disponível em:< <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/default.shtm>>. Acesso em 20 de Junho de 2015.

JAFARVAND, S; SHEMIRANI, F. Supramolecular-based dispersive liquid-liquid microextraction: determination of cadmium in water and vegetable samples. **Anal. Methods**. v.3, 2011.

JEANNOT, M. A.; CANTWELL, F. F. Solvent Microextraction into a Single Drop. **Anal. Chem.**, v.68, p.2236-2240, 1996.

KAWASHIMA, L. M; SOARES, L. M. V. Mineral profile of raw and cooked leafy vegetables consumed in Southern Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**. v.16, p. 605–611, 2003.

KOCÚROVÁ, L.; BALOGH, I. S.; ANDRUCH, V. Solvent microextraction: A review of recent efforts at automation. **Microchemical Journal**. v.110, p.599–607, 2013.

KOKOSA, J. M. Advances in solvent microextraction techniques. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 43, 2013.

KOKOSA, J. M. Recent trends in using single-drop microextraction and related techniques in green analytical methods. **Trends in Analytical Chemistry**. 2015.

LAPORTE, M. A. et al. Variability in Cadmium and Zinc shoot concentration in 14 cultivars of sunflower (*Helianthus annuus* L.) as related to metal uptake and partitioning. **Environmental and Experimental Botany**, 2014.

LI, C. C. et al. Internal distribution of Cd in lettuce and resulting effects on Cd trophic transfer to the snail: *Achatina fulica*. **Chemosphere**, v.135, p.123–128, 2015.

Lima. V. F.; Merçon, F. Metais Pesados no Ensino de Química. **Química Nova na Escola**. v. 33, nº 4, p. 199-205, nov. de 2011.

LIU, Y.; VIJVER, M.; PEIJNENBURG, W. J. G. M. Comparing three approaches in extending biotic ligand models to predict the toxicity of binary metal mixtures (Cu–Ni, Cu–Zn and Cu–Ag) to lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Chemosphere**. v.112, p.282–288, 2014.

LOPÉZ-GARCÍA, I.; VICENTE-MARTÍNEZ, Y.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Determination of cadmium and lead in edible oils by electrothermal atomic absorption spectrometry after reverse dispersive liquid–liquid microextraction. **Talanta**. v.124, p.106–110, 2014

MAGALHÃES, A.G. **Caracterização de genótipos de alface (*Lactuca sativa* L.) em cultivo hidropônico sob diferentes valores de condutividade elétrica da solução nutritiva**. 2006. 96 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2006.

MARCINKOWSKI, Ł. et al. Opportunities and shortcomings of ionic liquids in single-drop microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, 2015.

MALTEZ, H. F. **Desenvolvimento de metodologias analíticas baseadas em sistemas de pré-concentração empregando extração em fase sólida e microextração com gota única para determinação de metais-traço em amostras aquosas ambientais**. Tese (Doutorado). 137f. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

MILLER, J. N.; MILLER, J. C. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**. 6ed. Harlow: Person, 2010.

NORDBERG, G. F. et al. **Handbook on the Toxicology of Metals**. 3 ed. Elsevier, 2007.

OSHE, S.; DOURADO-NETO, D.; MANFRON, P. A. ; SANTOS, O.S. Qualidade de cultivares de alface produzidos em hidroponia. **Scientia Agrícola**, v.58, p.181-185, 2001.

PENA-PEREIRA, F.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Liquid-phase microextraction approaches combined with atomic detection: A critical review. **Analytica Chimica Acta**. v.669, p.1–16, 2010.

PERALTA-VIDEA, J. R.; LOPEZ, M. L.; NARAYAN, M. The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants: Implications for the food chain. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v.41, p.1665–1677, 2009.

PHILIPPI, Sonia T. et al. Pirâmide Alimentar Adaptada: Guia para escolha dos alimentos. **Rev. Nutr., Campinas**, v. 12, n. 1, p.65-80, jan./abr., 1999.

PINTO, E. et al. Changes in macrominerals, trace elements and pigments content during lettuce (*Lactuca sativa* L.) growth: Influence of soil composition. / **Food Chemistry**. v.152, p.603–611, 2014.

RAZAEI, M.; YAMINI, Y.; FARAJI, M. Evolution of dispersive liquid–liquid microextraction method. **Journal of Chromatography A**, v.1217, p.2342–2357, 2010.

REIS, B. F.; MIRANDA, C. E. S. e BACCAN, N. Pré-concentração empregando extração em fase líquida-fase sólida em sistemas de análise em fluxo com detecção espectrométrica. **Química Nova**. v. 19, n.6, p. 623-635, 1996.

ROJAS, F. S.; OJEDA, C. B.; PAVÓN, J. M. C. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with flame atomic absorption spectrometry for determination of cadmium in environmental, water and food samples. **Anal. Methods**. v.3, 2011.

SALA, F. C.; COSTA, C. P. Retrospectiva e tendência da alfaceicultura brasileira. **Horticultura Brasileira**. v.30, p.187-194, 2012.

SANTOS, I. C.; CASALI, V. W. D.; MIRANDA, G. V. Comportamento de dez cultivares de alface adubadas com composto de lixo urbano. **Pesq. Agropc. Bras.** n.2, v.33, p.157-161, 1998.

SANTOS, I. C.; MESQUITA, R. B. R.; RANGEL, A. O. S. S. Screening of cadmium and lead in potentially contaminated waters using a spectrophotometric sequential injection lab-on-valve methodology. **Talanta**, 2015.

SBARTAI, H. et al. Bioaccumulation du Cd et du Zn chez les plants de tomates (*Lycopersicon esculentum* L.). **C. R. Biologies.** v.335, p.585–593, 2012.

SAÇMACI, Ş.; KARTAL, Ş.; DURAL, S. Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Procedure for the Determination of Palladium by Flame Atomic Absorption Spectroscopy. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 23, n.6, p.1033-1040, 2012.

SHUTE, T.; MACFIE, S. M. Cadmium and zinc accumulation in soybean: A threat to food safety?. **Science of the Total Environment.** v.371, p. 63–73, 2006.

SILVA, G. S. et al. Viabilidade econômica do cultivo da alface crespa em monocultura e em consórcio com pepino. **Ciênc. agrotec., Lavras**, v. 32, n. 5, p. 1516-1523, set./out., 2008.

SILVA, S. M. C. S.; MURA, J. D. P. **Tratado de Alimentação, Nutrição e Dietoterapia.** São Paulo: Roca, 2007.

SILVA, E. N. et al. Use of in vitro digestion method and theoretical calculations to evaluate the bioaccessibility of Al, Cd, Fe and Zn in lettuce and cole by inductively coupled plasma mass spectrometry. **Microchemical Journal.** v.119, p.152–158, 2015.

SKOOG, Douglas A. **Fundamentos de Química Analítica.** 1.ed. São Paulo, SP: Cengage Learning, 2006.

SON, Y.O. et al. Cadmium induces carcinogenesis in BEAS-2B cells through ROS-dependent activation of PI3K/AKT/GSK-3 β / β -catenin signaling. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v.264, p.153–160, 2012.

SPIETELUN, A. et al. Green aspects, developments and perspectives of liquid phase microextraction techniques. **Talanta**, 2013.

TOPPI, L. S.; GABRIELLI, R. Response to cadmium in higher plants. **Environmental and Experimental Botany**. v.41, p. 105-130, 1999.

UNICAMP. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. 4 ed. ver e ampl. Campinas: NEPA / UNICAMP, 2011.

USDA. U.S. Department of Agriculture. **National Nutrient Database for Standard Reference Release 27**. Disponível em: <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/search>. Acesso em 11 de Agosto de 2015.

VILHAHUR, N.; VAHTER, M.; BROBERG, K. The Epigenetic Effects of Prenatal Cadmium Exposure. **Curr Envir Health Rpt** . v.2, p.195–203, 2015.

WAALKES, M. Cadmium carcinogenesis. **Mutation Research**. v.533, p.107–120, 2003.

WAITZBERG, Dan. L. **Nutrição Oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica**. 4.ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2009.

WEHRENS, R. **Chemometrics with R**. 1ed. Berlin: Springer, 2011.

WEN, X. et al. Determination of cadmium and copper in water and food samples by dispersive liquid–liquid microextraction combined with UV–vis spectrophotometry. **Microchemical Journal**, v.97, p.249–254, 2011.

WEN, X. et al. Comparison of ultrasound-assisted, surfactant-assisted and conventional dispersive liquid–liquid microextraction coupled with flame atomic absorption spectrometry for the determination of copper. **Anal. Methods**, 2013.

WHO – World Health Organization. Sixteenth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee of Food Additives. **Technical report series 505**. Geneva, Switzerland. 1972.

_____. Chromium. International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria 61. Geneva, Switzerland. 1988. 197 p. 37.

_____. Cadmium. International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria 134. Geneva, Switzerland. 1992.

VRIES, I.M. Origin and domestication of *Lactuca sativa* L. **Genetic Resources and Crop Evolution**. v.44, p.165–174, 1997.

ZORRIG, W. et al. Identification of three relationships linking cadmium accumulation to cadmium tolerance and zinc and citrate accumulation in lettuce. **Journal of Plant Physiology**. v.167, p.1239–1247, 2010.