



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE DE DOUTORADO

**Estratégia para a modelagem de dados de segunda ordem
usando cromatografia líquida para a quantificação de
pesticidas em hortaliças**

Emanuella Santos Sousa

João Pessoa
Fevereiro - 2020

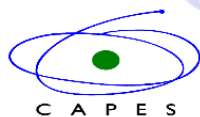
Emanuella Santos Sousa*

Estratégia para a modelagem de dados de segunda ordem usando cromatografia líquida para a quantificação de pesticidas em hortaliças

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Química, área de concentração Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Mário César Ugulino de Araújo (UFPB)

* Bolsista:



João Pessoa

Fevereiro – 2020

Catalogação na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S725e Sousa, Emanuella Santos.

Estratégia para a modelagem de dados de segunda ordem usando cromatografia líquida para a quantificação de pesticidas em hortaliças / Emanuella Santos Sousa. - João Pessoa, 2020.

123f. : il.

Orientação: Mário César Ugulino de Araújo.

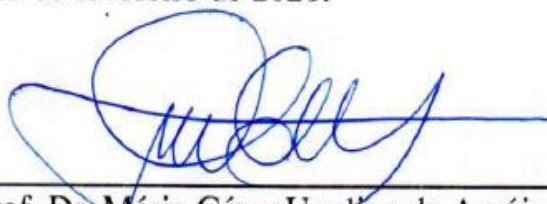
Tese (Doutorado) - UFPB/CCEN.

1. Resíduos de pesticidas. 2. HPLC-DAD. 3. Calibração multivias. 4. MCR-ALS. I. de Araújo, Mário César Ugulino. II. Título.

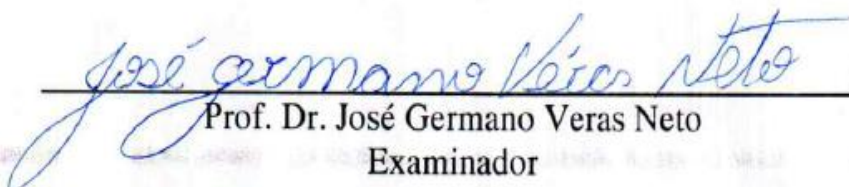
UFPB/BC

Estratégia para a modelagem de dados de segunda ordem usando cromatografia líquida para a quantificação de pesticidas em hortaliças.

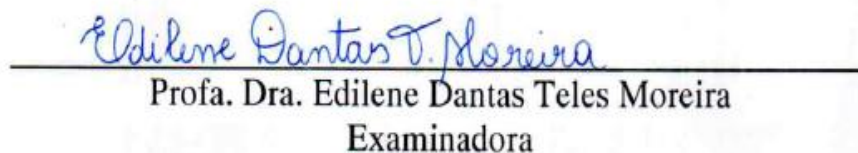
Tese de Doutorado apresentada pela aluna Emanuella Santos Sousa e aprovada pela banca examinadora em 19 de fevereiro de 2020.



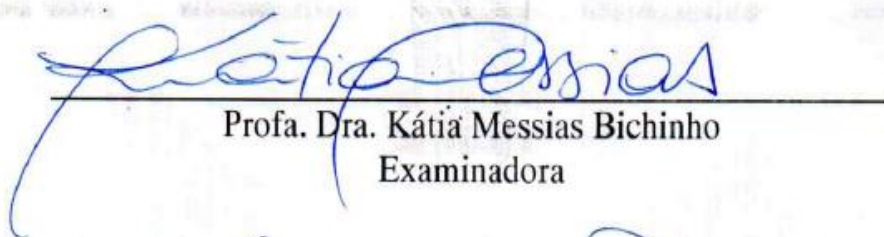
Prof. Dr. Mário César Ugulino de Araújo
Orientador/Presidente



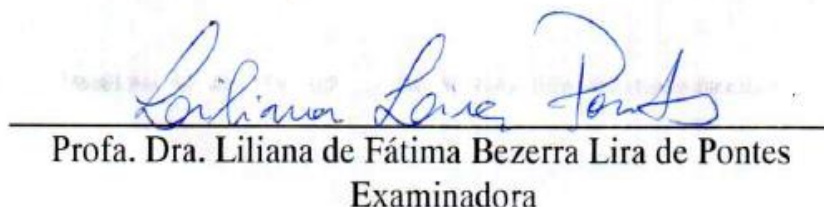
Prof. Dr. José Germano Veras Neto
Examinador



Profa. Dra. Edilene Dantas Teles Moreira
Examinadora



Profa. Dra. Kátia Messias Bichinho
Examinadora



Profa. Dra. Liliana de Fátima Bezerra Lira de Pontes
Examinadora

“Eu fui ensinada que o caminho do progresso não é nem rápido, nem fácil.”

Marie Curie

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por toda força e coragem. Aos meus pais, que sempre priorizaram pela minha educação. Aos meus familiares e amigos pelo carinho, compreensão, incentivo e apoio emocional.

Ao meu companheiro Martinelly, pela paciência, incentivo, dedicação, compreensão e amor, que a cada dia construímos e fortalecemos.

Ao professor Mário César Ugulino de Araújo pela confiança em acreditar que poderia evoluir cada vez mais.

Aos amigos do laboratório e vida Welma, Anabel, Amanda, David, Welington, Paulinho, Adriano, Válber, Stefani e aos demais colegas, pelas conversas, desabafos, consultas, discussões e pelos momentos de distração, risadas e cafezinhos. Levarei os momentos para o resto da vida.

Em especial ao meu amigo Neto (Licarion), com ele aprendi muito. Obrigada pela confiança, exemplo, respeito, dedicação e compreensão, essenciais para meu crescimento pessoal e profissional.

À Capes, pela bolsa concedida e apoio financeiro.

A todos aqueles que ajudaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho, sem os quais não seria possível a finalização.

RESUMO

Pesticidas são substâncias capazes de realizar o controle de propagação de pragas, aumentando o cultivo, produção e oferta dos alimentos, por isso, estão entre as classes de contaminantes de preocupação emergentes mais investigados no meio ambiente, pois podem ser encontrados no ar, solo, água e, principalmente, alimentos. O presente trabalho mostra um estudo do desenvolvimento de uma metodologia cromatográfica e calibração multivariada, utilizando as técnica quimiométricas como UPLS-RBL (Mínimos Quadrados Parciais Desdobrados com Bilinearização Residual) e MCR-ALS (Resolução de Curvas Multivariadas com Mínimos Quadrados Alternados), para quantificação de multirresíduos de pesticidas (carbendazim, tiabendazol, fuberidazol, carbofuran, carbaril, flutriafol e 1-naftol) em amostras de hortaliças obtidas na cidade de João Pessoa-PB. Os objetivos da pesquisa foram otimizar um método rápido e eficaz para a determinação desses agrotóxicos em amostras de hortaliças empregando a extração QuEChERS e a Cromatografia Líquida com Detecção por Arranjo de Diodos (LC-DAD). Para reduzir a quantidade de solvente gasto e o tempo de análise foi utilizada uma eluição gradiente, contudo, essa eluição ocasiona uma linha de base capaz de interferir na estimativa do posto da matriz de dados da calibração multivariada. Para solucionar esse problema, ocasionado pela técnica, foi proposto uma “limpeza quimiométrica”, realizando a subtração do branco de todas as amostras. Além disso, foi avaliada a performance de algoritmos de alinhamento, que buscam também contornar o deslocamento do tempo de retenção que ocorre entre medidas cromatográficas. Foram estudados a performance dos alinhamentos COW (Alinhamento por correlação otimizada), icoshift (Deslocamento correlacionado por intervalos) e coshift (Deslocamento correlacionado). Este último apresentou melhor desempenho nas amostras de calibração, todavia, nas amostras de hortaliças não obteve resultado satisfatório, causando distorções nos perfis espectrais e de eluição, não sendo utilizado como etapa de pré-tratamento das amostras. Na quantificação dos analitos as duas técnicas quimiométricas (UPLS-RBL e MCR-ALS) foram avaliadas a fim de alcançar a vantagem de segunda ordem. O MCR-ALS apresentou melhor desempenho nas amostras de calibração, com REP variando de 5,1 a 10,2% e limites de quantificação (LOQ) variando de 0,0093 a 0,058 mg L⁻¹, atendendo aos limites máximos de resíduos estabelecidos pela legislação brasileira (ANVISA). Já para o UPLS-RBL não foi possível obter erros de predição (REP) baixos, pois o modelo gerado levou em consideração a recuperação do próprio perfil do analito ou o perfil do constituinte coeluído. Nas amostras de hortaliças, que consiste em frutos, folhas e tubérculos, foi possível quantificar a presença de carbendazim e carbaril nas culturas de pimentão, alface, cenoura e beterraba, com concentrações variando entre 0,02 e 0,07 mg L⁻¹, contudo, esses pesticidas não são permitidos nestas culturas; carbofuran foi quantificado em quatro das seis amostras, com concentrações variando de 0,014 a 0,08 mg L⁻¹, sendo este agrotóxico não mais autorizado no país. Tiabendazol e flutriafol também foram quantificados, mas dentro dos limites estabelecidos pela legislação. Em suma, esta pesquisa pretende auxiliar no desenvolvimento de estudos de multirresíduos de pesticidas em matrizes mais complexas, considerando a obtenção da vantagem de segunda ordem adquirida por calibração multivariada. Além disso, é de extrema importância alertar a população para a segurança alimentar, com o intuito de cobrar de instituições governamentais todas as informações de pesquisas, uso e monitoramento dos resíduos de pesticidas.

Palavras – chave: Resíduos de pesticidas, HPLC-DAD, Calibração multivariada, MCR- ALS.

ABSTRACT

Pesticides are substances capable of controlling the spread of pests, increasing the cultivation, production and supply of food. For this reason, they are among the emerging pollutant classes of concern most investigated in the environment, as they can be found in the air, soil, water and, mainly, food. The present work shows a study of the development of a chromatographic methodology and multivariate calibration, using chemometric techniques such as UPLS-RBL (Unfold Partial Least Square with Residual Bilinearization) and MCR-ALS (Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Square), for quantification of multidrug residues of pesticides (carbendazim, thiabendazole, fuberidazole, carbofuran, carbaryl, flutriafol and 1-naphthol) in vegetable samples obtained in the city of João Pessoa-PB. The objectives of the research were to optimize a fast and effective method for the determination of these pesticides in vegetable samples using QuEChERS extraction and: Liquid Chromatography-Diode Array Detector (LC-DAD). To reduce the amount of solvent spent and the analysis time, a gradient elution was used, however, this elution causes a baseline capable of interfering in the rank estimate of the multivariate calibration data matrix. To solve this problem, caused by the technique, a “chemometric cleanup” was proposed, subtracting the blank from all samples. In addition, the performance of alignment algorithms was evaluated, which also seek to circumvent the shift in retention time that occurs between chromatographic measurements. The performance of the COW alignments (Correlation Optimized Warping), icoshift (Interval Correlation Optimized Shifting) and coshift (Correlation Optimized Shifting) were studied. The latter showed better performance in the calibration samples, however, in the vegetable samples it did not obtain a satisfactory result, causing distortions in the spectral and elution profiles, not being used as a pre-treatment step for the samples. In quantifying the analytes, the two chemometric techniques (UPLS-RBL and MCR-ALS) were evaluated in order to achieve the second order advantage. The MCR-ALS performed better in the calibration samples, with REP ranging from 5.1 to 10.2% and quantification limits (LOQ) ranging from 0.0093 to 0.058 mg L⁻¹, meeting the maximum residue limits established Brazilian legislation (ANVISA). For the UPLS-RBL, it was not possible to obtain low prediction errors (REP), since the model generated took into account the recovery of the analyte profile itself or the profile of the coeluted constituent. In the samples of vegetables, which consists of fruits, leaves and tubers, it was possible to quantify the presence of carbendazim and carbaryl in the cultures of peppers, lettuce, carrots and beets, with concentrations ranging between 0.02 and 0.07 mg L⁻¹, however, these pesticides are not allowed in these crops; carbofuran was quantified in four of the six samples, with concentrations ranging from 0.014 to 0.08 mg L⁻¹, this pesticide is no longer authorized in the country. Thiabendazole and flutriafol were also quantified, but within the limits established by the legislation. In short, this research aims to assist in the development of studies of multiresidue pesticides in more complex matrices, considering the obtaining of the second order advantage acquired by multipath calibration. In addition, it is extremely important to alert the population to food security, in order to collect from government institutions all information on research, use and monitoring of pesticide residues.

Keywords: Pesticide residues, HPLC - DAD, Multiway calibration, MCR - ALS.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Esquema de representação dos contaminantes emergentes (CE) alvos (target) e suas principais fontes..... 25
- Figura 2** - Representação gráfica do consumo de agrotóxicos nos anos de 2012 a 2014 por região. Relatórios de Comercialização de Agrotóxicos - Boletim Anual de Produção, Importação, Exportação e Vendas de Agrotóxicos no Brasil..... 27
- Figura 3** - Resumo do registro de agrotóxicos e afins no Brasil nos anos de 2005 a 2019..... 27
- Figura 4** - Representação do monitoramento das 4.616 amostras de alimentos..... 28
- Figura 5** - Representação dos modos de obtenção dos dados para uma amostra e para um conjunto de amostras. 37
- Figura 6** - Representação do cromatograma em 3D obtido por um sistema LC-DAD e suas formas de obtenção dos dados. I) ordem zero, onde uma grandeza é correlacionada com a concentração do analito em um determinado comprimento de onda e tempo de retenção; II) primeira ordem, obtém-se um vetor dados, fixando um comprimento de onda e varrendo todo o cromatograma no tempo de retenção, ou fixando um tempo e varrendo todo o espectro; III) segunda ordem, uma matriz de dados..... 38
- Figura 7** - Esquema de desdobramento e construção do modelo UPLS. Tensor tridimensional desdobrado e representado por um cubo de dados ($\mathbf{i} \times \mathbf{jk}$)..... 41
- Figura 8** - Esquema de geração de uma matriz aumentada e decomposição com o MCR- ALS. Tensor tridimensional aumentado, representado por um cubo de dados ($\mathbf{ij} \times \mathbf{k}$), e decomposto em C aumentada ($\mathbf{i} \times \mathbf{j}$), contendo os perfis cromatográficos puros de cada constituinte presente na matriz, nesse caso tem-se $\mathbf{i}=3$, $\mathbf{S}^T$ ($\mathbf{i} \times \mathbf{k}$), representa os perfis espectrais de cada constituinte da matriz, E aumentada ($\mathbf{ij} \times \mathbf{k}$) são os resíduos de decomposição, onde, $\mathbf{i}$ representa o número de amostras, $\mathbf{j}$ os tempos de eluição e $\mathbf{k}$ os comprimentos de onda para cada amostra..... 44
- Figura 9** - Fluxograma de representação do ajuste feito por três restrições na etapa de otimização do MCR-ALS..... 46
- Figura 10** - Planejamento composto central – CCD para três fatores. (●) planejamento fatorial, (●) experimentos axiais e (●) ponto central. 52
- Figura 11**- Etapas do método de extração QuEChERS..... 57
- Figura 12** - a) Interface gráfica do MVC2 para o MCR-ALS b) UPLS-RBL. Marcado em vermelho, a escolha do modelo, tamanho dos dados, e para o MCR-ALS, as restrições..... 59
- Figura 13** - Perfis de eluição cromatográfica. a) branco, b) perfil do nível 2 ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$) do conjunto de calibração e c) perfil do nível 2 subtraído do branco. Lado esquerdo, perfis em 3D e lado direito, os perfis em 2D, registrados em 210 nm. A escolha desse comprimento de onda é devido a sensibilidade que todos os analitos apresentam. 62
- Figura 14** - Cromatogramas em 2D dos perfis de eluição dos conjuntos de calibração (a) e (b) validação (teste). O destaque em cor é a amostra 7 do conjunto de calibração (15 mg L^{-1} para CBZ, TBZ e FBZ; 9 mg L^{-1} CBF; $5,5 \text{ mg L}^{-1}$ CBR; 11 mg L^{-1} NFT e 24 mg L^{-1} FLT). CBZ (—), TBZ (—), FBZ (—), CBF (—), CBR (—), FLT (—), NFT (—). 63
- Figura 15** - a) Divisão das regiões no cromatograma 3D para convergência dos algoritmos. Região I (4,6-5,7 min), Região II (5,7-7,0 min), Região III (8,0-8,7 min), Região IV (8,7-10,4

min). **b)** Cromatogramas do conjunto de calibração em 2D registrados em 210 nm. CBZ (—), TBZ (—), FBZ (—), CBF (—), CBR (—), FLT (—), NFT (—). 64

Figura 16 – Cromatogramas, registrados em 2D no comprimento de 210 nm, das regiões I (CBZ) e II TBZ e FBZ) nos conjuntos: **(a)** Calibração e **(b)** validação ou teste. Cromatogramas 2D dos conjuntos de calibração **(c)** e teste **(d)**, após o alinhamento COW. CBZ (—), TBZ (—), FBZ (—). As setas indicam o tempo de retenção do pico de cada analito com e sem alinhamento. 66

Figura 17 - **a)** Cromatogramas em 3D registrados após o alinhamento da região I com o algoritmo COW da amostra 2 do conjunto de calibração (0,1 mg L⁻¹) e **b)** da amostra 7 do conjunto de calibração (15 mg L⁻¹ para CBZ, TBZ e FBZ; 9 mg L⁻¹ CBF; 5,5 mg L⁻¹ CBR; 11 mg L⁻¹ NFT e 24 mg L⁻¹ FLT. As setas indicam a fragmentação do perfil espectral, ou seja, falta de informação em alguns comprimentos de onda. 67

Figura 18 - Cromatogramas do conjunto de calibração em 2D, registrados em 210 nm **(a - c)** para 21, 42 e 63 variáveis, respectivamente. CBZ (—), TBZ (—), FBZ (—). 68

Figura 19 - Cromatogramas do conjunto de calibração em 3D, registrados em 210 nm **(a - c)** para 21, 42 e 63 variáveis 69

Figura 20 - **a)** Cromatogramas do conjunto de calibração em 2D registrados em 210 nm, alinhados com coshift divididos em duas regiões. **b)** Cromatogramas do conjunto de validação em 2D registrados em 210 nm, alinhados com divisão em duas regiões. **c)** e **d)** Conjunto de calibração validação alinhados com divisão em quatro regiões, respectivamente. CBZ (—), TBZ (—), FBZ (—), CBF (—), CBR (—), FLT (—), NFT (—). As setas indicam o tempo de retenção do pico de cada analito com e sem alinhamento. 70

Figura 21 - **a)** Cromatogramas 3D, após alinhamento coshift, da amostra 2 do conjunto de calibração (0,1 mg L⁻¹ para todos os analitos). **b)** Amostra 7 do conjunto de calibração (15 mg L⁻¹ para CBZ, TBZ e FBZ). 71

Figura 22 - Gráfico do número de PRESS (somatório quadrático do erro de predição) versus o número de fatores ou variáveis latentes. CBZ (—), TBZ (—), FBZ (—), CBF (—), CBR (—), FLT (—), NFT (—). 73

Figura 23 - Perfis recuperados da amostra 7 do conjunto de validação (aplicação do RBL no modo de eluição e espectrais. Em **a)** Perfil de eluição de TBZ; **b)** Perfil de eluição de CBR e **c)** e **d)** são apresentados os perfis espectrais de TBZ e NFT em linhas pontilhadas pretas (—●—●—●), e em cores (vermelho e ciano), os perfis reais desses analitos. TBZ (—), CBR (—), NFT (—). 75

Figura 24 - Perfis espectrais recuperados pelo MCR-ALS em **a)** Região I (CBZ), **b)** Região II (TBZ e FBZ), **c)** Região III (CBF) e **d)** Região IV (CBR, FLT e NFT), CBZ (—), TBZ (—), FBZ (—), CBF (—), CBR (—), FLT (—), NFT (—), Perfis espectrais reais dos constituintes sobreposto ao perfil recuperado MCR (—●—●—●). 81

Figura 25 - Perfis de concentração recuperados pelo MCR-ALS em **a)** CBZ, **b)** TBZ, **c)** FBZ, **d)** CBF, **e)** CBR, **f)** FLT, **g)** NFT e **h)** Perfil de eluição mostrando o alargamento de pico que ocorre na amostra 8 de calibração CBZ (—), TBZ (—), FBZ (—), CBF (—), CBR (—), FLT (—) e NFT (—). 82

Figura 26 - Concentração predita versus nominal das amostras de calibração em: **a)** CBZ (■), **b)** TBZ (■), **c)** FBZ (■), **d)** CBF (■), **e)** CBR (■), **f)** FLT (■) e **g)** NFT (■). 83

Figura 27 - Perfis de concentração recuperados **a)** amostra de calibração 7 e **b)** amostra de validação 8 com o número de componentes escolhidas para cada região, CBZ (—), TBZ (—), FBZ (—), CBF (—), CBR (—), FLT (—), NFT (—). 84

Figura 28 - Concentração predita versus nominal das amostras de validação (teste) em: **a)** CBZ (●), **b)** TBZ (●), **c)** FBZ (●), **d)** CBF (●), **e)** CBR (●), **f)** FLT (●) e **g)** NFT (●). Em **h)** elipse de confiança (EJCR) representados com as cores de cada analito. 85

Figura 29 - Perfis de eluição cromatográficas das seis amostras de hortaliças representados em cinco níveis de concentração para: **a)** tomate (—), **b)** pimentão (—), **c)** couve (—), **d)** alface (—), **e)** cenoura (—), **f)** beterraba (—), de acordo com **Tabela 4 da seção 3.4** 89

Figura 30 - Perfis de eluição cromatográficas, em superfície de contorno, das seis amostras de hortaliças apresentadas no nível 5 de concentração (10 mg L⁻¹ para CBZ, TBZ e FBZ; 6 mg L⁻¹ para CBF, 3,0 mg L⁻¹ para CBR, e 15 e 9,0 mg L⁻¹ para FLT e NFT, respectivamente), para: **a)** tomate, **b)** pimentão, **c)** couve, **d)** alface, **e)** cenoura e **f)** beterraba..... 90

Figura 31 - Perfis de eluição cromatográficas das seis amostras de hortaliças representados em cinco níveis de concentração para: **a)** tomate (—), **b)** pimentão (—), **c)** couve (—), **d)** alface (—), **e)** cenoura (—), **f)** beterraba (—). O perfil cromatográfico da amostra 7 do conjunto de calibração, em preto (—)..... 91

Figura 32 - Inspeção do cromatograma em 3D, com alinhamento coshif das amostras de hortaliças. **a)** e **a1)** tomate, **b)** e **b1)** pimentão, **c)** e **c1)** couve, **d)** e **d1)** alface, **e)** e **e1)** cenoura e **f)** e **f1)** beterraba. Os subitem 1 corresponde a amostra em outro ângulo. As setas vermelhas apontam para a falta ou quebra de informações em alguns comprimentos de onda após etapa de alinhamento das amostras..... 93

Figura 33 – Perfis de eluição cromatográficas, das regiões 1 (contém CBZ) (**a** - **f**) e região 2 (contém TBZ e FBZ), (**a1** - **f1**) das seis amostras de hortaliças após alinhamento coshift: as cores das linhas variam de acordo com a amostra: **a)** tomate (—), **b)** pimentão (—), **c)** couve (—), **d)** alface (—), **e)** cenoura (—), **f)** beterraba (—). O perfil cromatográfico da amostra 7 do conjunto de calibração, em preto (—). As setas apontam para a falta ou quebra de informações nos tempos de retenção após etapa de alinhamento das amostras. 94

Figura 34 - Perfis cromatográficos recuperados por MCR-ALS para o nível quatro da adição de padrão para amostra de **TOMATE**. **a)** Região I (CBZ), **b)** Região II (TBZ e FBZ), **c)** Região III (CBF) e **d)** Região IV (CBR, FLT e NFT). CBZ (—), TBZ (—), FBZ (—), CBF (—), CBR (—), FLT (—), NFT (—). De **a1-d1** os perfis espectrais recuperados. Em cinza (—) são os interferentes e seus respectivos perfis espectrais..... 96

Figura 35 - Avaliação do efeito de matriz através da comparação entre as inclinações das amostras de teste e amostras de hortaliças para cada analito: **a)** CBZ, **b)** TBZ, **c)** FBZ, **d)** CBF, **e)** CBR, **f)** FLT e **g)** NFT em teste (●), tomate (●), pimentão (●), alface, (●) cenoura (●) e beterraba (●). 97

Figura A 1- Perfis cromatográficos recuperados por MCR-ALS para o nível quatro da adição de padrão para amostra de **PIMENTÃO**. **a)** Região I (CBZ), **b)** Região II (TBZ e FBZ), **c)** Região III (CBF) e **d)** Região IV (CBR, FLT e NFT). CBZ (—), TBZ (—), FBZ (—), CBF (—), CBR (—), FLT (—), NFT (—). De **a1-d1** os perfis espectrais recuperados. Em cinza (—) são os interferentes e seus respectivos perfis espectrais..... 116

Figura A 2 - Perfis cromatográficos recuperados por MCR-ALS para o nível quatro da adição de padrão para amostra de **COUVE**. **a)** Região I (CBZ), **b)** Região II (TBZ e FBZ), **c)** Região III (CBF) e **d)** Região IV (CBR, FLT e NFT). CBZ (—), TBZ (—), FBZ (—), CBF (—), CBR

(—), FLT (—), NFT (—). De **a1-d1** os perfis espectrais recuperados. Em cinza (—) são os interferentes e seus respectivos perfis espectrais..... **117**

Figura A 3 - Perfis cromatográficos recuperados por MCR-ALS para o nível quatro da adição de padrão para amostra de **ALFACE**. **a)** Região I (CBZ), **b)** Região II (TBZ e FBZ), **c)** Região III (CBF) e **d)** Região IV (CBR, FLT e NFT). CBZ (—), TBZ (—), FBZ (—), CBF (—), CBR (—), FLT (—), NFT (—). De **a1-d1** os perfis espectrais recuperados. **118**

Figura A 4 - Perfis cromatográficos recuperados por MCR-ALS para o nível quatro da adição de padrão para amostra de **CENOURA**. **a)** Região I (CBZ), **b)** Região II (TBZ e FBZ), **c)** Região III (CBF) e **d)** Região IV (CBR, FLT e NFT). CBZ (—), TBZ (—), FBZ (—), CBF (—), CBR (—), FLT (—), NFT (—). De **a1-d1** os perfis espectrais recuperados. **119**

Figura A 5 - Perfis cromatográficos recuperados por MCR-ALS para o nível quatro da adição de padrão para amostra de **BETERRABA**. **a)** Região I (CBZ), **b)** Região II (TBZ e FBZ), **c)** Região III (CBF) e **d)** Região IV (CBR, FLT e NFT). CBZ (—), TBZ (—), FBZ (—), CBF (—), CBR (—), FLT (—), NFT (—). De **a1-d1** os perfis espectrais recuperados. **120**

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Dados de culturas permitidas (Codex e ANVISA) e características químicas (massa molar e estrutura molecular) dos agrotóxicos em estudo.	31
Tabela 2- Matriz do planejamento do conjunto teste.	55
Tabela 3- Níveis de concentração utilizados no planejamento CCD para o conjunto teste em mg L ⁻¹	56
Tabela 4 - Níveis de concentração utilizados nos testes de efeito de matriz e recuperação em mg L ⁻¹	57
Tabela 5 – Variância explicada e ajuste residual para os modelos construídos com base no conhecimento químico e construídos pelo PRESS do UPLS.	74
Tabela 6 - Variância explicada e ajuste residual do modelo construído com base na composição química do sistema.	76
Tabela 7 - Métricas de desempenho analítico para o modelo UPLS-RBL com dados alinhados.	77
Tabela 8 - Avaliação de similaridade estatística dos valores de predição do MCR-ALS, antes e após alinhamento com coshift.	79
Tabela 9 - Resultado da variância explicada e do ajuste residual em função das componentes adicionadas no conjunto de validação por MCR-ALS.	79
Tabela 10 - Resultados do MCR-ALS para a previsão dos analitos estudados no conjunto de validação.	86
Tabela 11 - Métricas de desempenho analítico para o modelo de MCR-ALS.	87
Tabela 12 - Quantificação dos resíduos de pesticidas em amostras de hortaliças usando MCR - ALS e método de adição de padrão.	99
Tabela 13 - Metodologias cromatográficas relatadas para quantificação de resíduos de pesticidas em hortaliças e frutas.	103
Tabela 1A- Apresentação dos testes estatísticos de Student (t) e Distribuição F de Fischer-Snedecor à 95%.	121

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária;
ASTM	Sociedade Americana de Testes e Materiais (do inglês: <i>American Society for Testing and Materials</i>);
C18	Octadecilsilano;
CAR	Carbendazim;
CBF	Carbofuran;
CBR	Carbaril;
CCD	Planejamento de composto central (do inglês: <i>Central Composite Design</i>);
CE	Contaminantes emergentes (do inglês: <i>emerging contaminant</i>);
CG-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (do inglês: <i>Gas Chromatography – Mass Spectrometry</i>);
coshift	Deslocamento correlacionado (do inglês: <i>Correlation Optimized Shifting</i>);
COW	Alinhamento por correlação otimizada (do inglês: <i>Correlation Optimized Warping</i>);
DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva (do inglês: <i>Dispersive liquid-liquid microextraction</i>);
d-SPE	Extração em fase sólida dispersiva (do inglês: <i>Dispersive Solid phase Extraction</i>);
EC	<i>European Commission</i> ;
EFA	Análise evolucionária de fatores (do inglês: <i>Evolving Factor Analysis</i>);
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (do inglês: <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>);
FBZ	Fuberidazol;
FDA	Administração de Comidas e Remédios (do inglês: <i>Food and Drug Administration</i>);
FLT	Flutriafol;
GCB	Carbono grafitizado (do inglês: <i>Graphitized Carbon Black</i>);
icoshift	Deslocamento correlacionado por intervalos – (do inglês: <i>Interval Correlation Optimized Shifting</i>);
IDMT	Ingestão diária máxima teórica;
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia;

LC-DAD	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria UV/Vis com arranjo de diodos (do inglês: <i>Liquid Chromatography - Diode Array Detector</i>);
LC-EEM	Cromatografia líquida acoplada à espectrofluorimetria molecular de excitação/emissão (do inglês: <i>Liquid Chromatography - Excitation Emission Matriz</i>);
LC-LC-DAD	Cromatografia líquida bidimensional com detector de arranjo de diodos (do inglês: <i>Two-Dimensional Liquid Chromatography with Diode Array Detection</i>);
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (do inglês: <i>Liquid Chromatography - Mass Spectrometry</i>);
LLE	Extração líquido-líquido (do inglês: <i>Liquid-liquid extraction</i>);
LMR	Limites máximos de resíduos;
LOD	Limite de detecção (do inglês: <i>limit of detection</i>);
LOQ	Limite de quantificação (do inglês: <i>limit of quantification</i>);
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento;
MCR-ALS	Resolução de curvas multivariadas com mínimos quadrados alternado (do inglês: <i>Multivariate Curve Resolution – Alternating Least Square</i>);
MNPs	Nanopartículas magnéticas (do inglês: <i>Magnetic nanoparticles</i>);
NA	Não autorizado;
NAS	Sinal analítico líquido (do inglês: <i>Net Analyte Signal</i>);
NFT	1-Naftol;
NIR	Infravermelho próximo (do inglês: <i>near infrared</i>);
NPLS -RBL	Mínimos quadrados parciais multidimensionais com bilinearização residual (do inglês: <i>Multidimensional - Partial Least Square</i>);
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos;
PARAFAC	Análise de fatores paralelos (do inglês: <i>PARAllel FACtor analysis</i>);
PSA	Amina primária secundária (do inglês: <i>Primary Secondary Amine</i>);
QuEChERS	Rápido, Fácil, Baixo custo, Eficaz, Robusto e Seguro (do inglês: <i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe</i>);
RMSEP	Raiz quadrada do erro médio de previsão (do inglês: <i>Root Mean Squares Error of Prediction</i>);
SEN	Sensibilidade;

SIMPLISMA	Análise de mistura auto modelável iterativa simples de usar (do inglês: <i>Simple-to-use interactive self-modeling mixture analysis</i>);
SPE	Extração em fase sólida (do inglês: <i>solid phase extraction</i>);
SVD	Decomposição de valores singulares (do inglês: <i>Single value decomposition</i>);
TBZ	Tiabendazol;
UPLS – RBL	Mínimos quadrados parciais desdobrados com bilinearização residual (do inglês: <i>Unfold Partial Least Square with Residual Bilinearization</i>);
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (do inglês: <i>United States Environmental Protection Agency</i>).

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELA	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiii
1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Caracterização da proposta	19
1.2 Objetivos.....	22
1.2.1 Objetivo geral	22
1.2.2 Objetivos específicos	22
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	24
2.1 Contaminantes de preocupação emergente.....	24
2.1.1 Pesticidas	25
2.2 Cromatografia e preparo de amostras para resíduos de pesticidas.....	32
2.3 Quimiometria	35
2.3.1 Multilinearidade.....	39
2.4 UPLS - RBL.....	41
2.5 MCR - ALS.....	43
2.6 Parâmetros de desempenho analítico.....	47
2.7 Alinhamento de pico em dados cromatográficos	49
2.8 Planejamento experimental	50
3 METODOLOGIA.....	54
3.1 Reagentes	54
3.2 Conjuntos de calibração e teste	54
3.3 Preparo das amostras para quantificação de resíduos de pesticidas	56
3.4 Efeito de matriz.....	57
3.5 Análise cromatográfica	58
3.6 Software e análise de dados	58
3.6.1 UPLS- RBL	59

3.6.2 MCR – ALS.....	59
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4.1 Subtração do branco e escolha da faixa de trabalho	61
4.2 Alinhamento dos dados	65
4.3 Calibração utilizando UPLS - RBL.....	72
4.4 Calibração utilizando MCR - ALS.....	78
4.5 Amostras de hortaliças	88
4.5.1 Alinhamento das amostras de hortaliças	92
4.5.2 Quantificação de resíduos de pesticidas em hortaliças	95
4.6 Avaliação da metodologia proposta frente a outras metodologias encontradas na literatura	102
5 CONCLUSÕES FINAIS	105
REFERÊNCIAS	107
APÊNDICE A	116
FIGURAS	116
APÊNDICE B.....	121
TABELA	121
APÊNDICE C	122
ARTIGOS.....	122
1. Artigo da tese.....	122
2. Outros artigos publicados durante o doutorado relacionados a calibração de ordem superior e cromatografia à líquido.	123



CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Caracterização da proposta

A industrialização, guerras, minerações e, principalmente, a agricultura deixaram um legado de contaminação dos recursos naturais em todo o planeta. A agricultura moderna, intensificada pela aceleração da urbanização, tornou o solo, a água e o ar um ralo que escoia inúmeras quantidades de substâncias que contribuem para problemas de contaminação (Rodríguez-Eugenio, McLaughlin, Pennock, 2018). Os poluentes ou contaminantes emergentes - CE (do inglês: *emerging contaminant*), refere-se a muitas substâncias sintéticas ou naturais que têm o potencial de causar efeitos ambientais ou humanos adversos conhecidos ou suspeitos à saúde (Dimpe, Nomngongo, 2016; Rodríguez-Eugenio, McLaughlin, Pennock, 2018). Atualmente são denominados como contaminante de preocupação emergente e estão se tornando alvo de estudos intensivos durante as últimas décadas na intenção de descrever os desafios e tendências futuras para monitorar, regulamentar e alertar quanto ao uso desenfreado desses compostos (Dimpe and Nomngongo, 2016; Geissen et al., 2015; Hermes, Jewell, Wick, Ternes, 2018; Taheran, Naghdi, Brar, Verma, Surampalli, 2018). Tais contaminantes são, geralmente, oriundos de produtos de uso diário, entre os quais estão os farmacêuticos, plastificantes, higiene pessoal, pesticidas, produtos químicos industriais, que são lançados no meio ambiente, seja ele aquático, atmosférico ou solo (Hermes et al., 2018; Taheran et al., 2018).

Para a quantificação desses contaminantes em matrizes ambientais, onde se encontra a presença de analitos e interferentes em concentrações muito baixas, na ordem de ppb (partes por bilhão), técnicas com alta precisão e resolução são requeridas, e as cromatografias líquida e gasosa mostram-se eficientes devido a separação dos constituintes da matriz (Megson et al., 2016).

Embora as técnicas cromatográficas tragam vantagens como eficiência em separações e poder de resolução para identificação dos compostos, uma etapa de pré tratamento da amostra é necessária para aumentar a sensibilidade da resposta analítica. Muitas vezes é uma das etapas que requer maior tempo quando se trabalha com métodos de separação a fim de reduzir a presença de interferentes antes da análise, evitando a coeluição de analitos não esperados aos analitos alvos (Dimpe, Nomngongo, 2016; Megson et al., 2016; Ocaña-González, Villar-Navarro, Ramos-Payán, Fernández-Torres, e Bello-López, 2015; Zuloaga et al., 2012).

As principais metodologias de preparo de amostra para análise de contaminantes emergentes, principalmente as utilizadas para análise de resíduos de pesticidas, são baseadas na extração em fase sólida SPE (do inglês: *solid phase extraction*), o QuEChERS - rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro (do inglês: *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*), microextração líquido-líquido dispersiva – DLLME (do inglês: *dispersive liquid-liquid microextraction*), ou outros métodos baseados em nanopartículas magnéticas (Dimpe, Nomngongo, 2016a; Liu et al., 2017; Picó, Alfarham; Barceló, 2017; Yang, Luo, Duan, Li, e Liu, 2018).

Mesmo com esse pré-tratamento, pode não ocorrer eliminação total de compostos não desejados, pois matrizes ambientais, como por exemplo, água, alimentos e ar, são muito complexas e contam com a presença de inúmeros de constituintes (Picó, Alfarham, e Barceló, 2017).

Uma alternativa frente a estes problemas está na utilização de técnicas quimiométricas de ordem superior (Boeris, Arancibia e Olivieri, 2014; Mas, de Juan, Tauler, Olivieri, e Escandar, 2010; Montemurro et al., 2016; Moreira, Pinto, Gomes, Goicoechea, e Araújo, 2015; Pinto, Díaz Nieto, Zón, Fernández, de Araujo, 2016). Atualmente, mostram-se uma ferramenta poderosa em busca de reduzir o tempo de análise e contornar problemas que impeçam a validação da metodologia desenvolvida mesmo na presença de interferentes. Muitos trabalhos com ordem superior têm sido apresentados com diversos detectores, a saber: cromatografia líquida acoplada à espectrometria UV/Vis com arranjo de diodos (LC-DAD – do inglês: *Liquid Chromatography - Diode Array Detector*), espectrofluorimetria molecular de excitação/emissão (LC-EEM – do inglês: *Liquid Chromatography - Excitation Emission Matrix*) e espectrometria de massas (LC-MS – do inglês: *Liquid Chromatography - Mass Spectrometry*) (Alcaráz, Siano, Culzoni, de la Peña, Goicoechea, 2014; Boeris et al., 2014; Maggio, Damiani, Olivieri, 2011; Moreira et al., 2015; Pérez, Escandar, 2014).

Para alcançar a vantagem de segunda ordem, ou seja, prever concentrações de componentes da amostra na presença de outros constituintes, são utilizados alguns algoritmos quimiométricos, como: Análise de fatores paralelos (PARAFAC – do inglês: *PARAllel FACtor analysis*); Resolução de curvas multivariadas com Mínimos Quadrados Alternados (MCR-ALS – do inglês: *Multivariate Curve Resolution – Alternating Least Square*); Mínimos Quadrados Parciais Desdobrados (UPLS – do inglês: *Unfold - Partial Least Square*); Mínimos Quadrados Parciais Multidimensionais (NPLS – do inglês: *Multidimensional - Partial Least Square*); estes dois últimos seguido de uma etapa de

bilinearização residual (RBL – do inglês: *Residual bilinearization*) (Arancibia, Damiani, Escandar, Ibañez, Olivieri, 2012; de la Peña, Goicoechea, Escandar, Olivieri, 2015; Escandar, Goicoechea, Muñoz de la Peña, Olivieri, 2014; Olivieri, Escandar, 2000).

Antes da aplicação dos algoritmos, para qualquer conjunto de dados multilineares, é importante conhecer as possibilidades de expressão genérica de uma matriz de dados em função linear das concentrações dos componentes e o modo dos perfis de dados. Isso definirá a aplicação de ferramentas corretas (Arancibia et al., 2012). No caso de dados cromatográficos, a avaliação dos constituintes na amostra e a avaliação dos perfis no modo de tempo de retenção, requer o uso de algoritmos capazes de modelar a variação do modo temporal, permitindo os desvios da multilinearidade. Mesmo diante dessas possibilidades de utilizar algoritmos capazes de modelar esse deslocamento, é ainda possível utilizar métodos de alinhamento, como o deslocamento correlacionado por intervalos - *icoshift* (do inglês: *Interval Correlation Optimized Shifting*), deslocamento correlacionado - *coshift* (do inglês: *Correlation Optimized Shifting*) e alinhamento por correlação otimizada - *COW* (do inglês: *Correlation Optimized Warping*), que são eficazes em realizar correções através de funções que possibilitam a otimização do perfil do pico, com compressão ou alongamento, ou ter efeito significativo na convergência do algoritmo, permitindo definir o aglomerado de picos aleatórios (Bloemberg, Gerretzen, Lunshof, Wehrens, Buydens, 2013; Nielsen, Carstensen, Smedsgaard, 1998; Tomasi, Savorani, Engelsen, 2011; Tomasi, Van Den Berg, Andersson, 2004).

Desse modo, o desenvolvimento de novas metodologias que propõe estratégias associando as técnicas cromatográficas, quimiométricas e preparo de amostras, serão discutidos ao longo desse trabalho a fim de realizar a quantificação simultânea, rápida e baixo custo, de sete resíduos de pesticidas.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Desenvolver uma metodologia analítica utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Arranjo de Diodos (HPLC-DAD), associada à quimiometria, para a determinação de resíduos de pesticidas em amostras de hortaliças.

1.2.2 Objetivos específicos

- Contornar a problemática da mudança de linha de base, oriunda da eluição gradiente, utilizando a correção de linha de base, subtraindo o sinal do banco dos dados das amostras, para avaliação do desempenho das técnicas de calibração multivias;
- Avaliar o desempenho do alinhamento dos picos utilizando COW, *coshift* e *icoshift* para os padrões;
- Construir modelos de calibração para cada analito empregando soluções padrão para avaliar o desempenho dos algoritmos UPLS-RBL e MCR-ALS na quantificação de carbendazim, tiabendazol, fuberidazol, carbofuran, carbaril, flutriafol e 1 - naftol;
- Aplicar o modelo com melhor desempenho, construído na predição dos resíduos de pesticidas em amostras de hortaliças.



CAPÍTULO 2

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Contaminantes de preocupação emergente

Muitos compostos químicos estão se tornando alvo de estudos devido ao crescimento exponencial dos impactos causados aos seres vivos, mostrando-se muitas vezes nocivos à saúde humana e aos ecossistemas ambientais (USEPA, 2019; Dimpe, Nomngongo, 2016).

Os chamados Contaminantes Emergentes, atualmente denominados de Contaminantes de preocupação emergente – CECs (do inglês: *Contaminants of emerging concern*) são, segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA – do inglês: *United States Environmental Protection Agency*), poluentes que atualmente não são incluídos em programas de monitoramento e que começam a ser controlados e legislados a partir de estudos de toxicidade e ocorrências ambientais (USEPA, 2017).

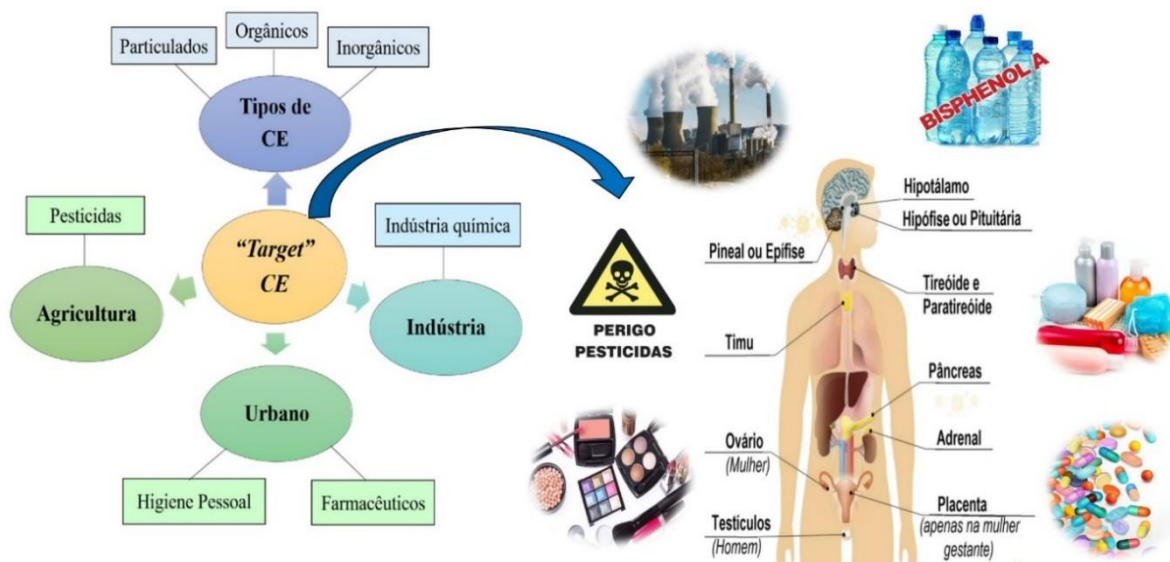
Atualmente são contabilizadas mais de 700 substâncias e metabólitos capazes de causar danos ao meio ambiente (Geissen et al., 2015). A lista de candidatos a contaminantes – CCL (do inglês: *Contaminant Candidate List*) - inicia sua atualização para a quinta edição a fim de priorizar esforços, pesquisas e coleta de dados para regular algum contaminante novo. A última edição, CCL4, finalizada em novembro de 2016, incluiu 97 produtos químicos ou grupos químicos e 12 contaminantes microbianos. (USEPA, 2019).

Os contaminantes mais investigados sobre os possíveis efeitos à saúde e os níveis em que são encontrados são produtos sintéticos ou naturais, classificados como tóxicos, persistentes e bioacumuláveis, como os de higiene pessoal, pesticidas, produtos farmacêuticos, compostos perfluorados, interferentes endócrinos, toxinas biológicas, agentes patogênicos, entre outros (USEPA, 2019; Dimpe e Nomngongo, 2016; Zuloaga et al., 2012; Xu, Wang, Cai, 2013; Megson et al., 2016; Pedrouzo, Borrull, Marcé, Pocurull, 2011; Ocaña-González, Villar-Navarro, Ramos-Payán, Fernández-Torres, Bello-López, 2015). Estudos recentes revelam que em sistemas biológicos, as rotas hormonais podem causar interferência no sistema endócrino, a má formação congênita, causados pela longa exposição dessas substâncias e câncer (USEPA, 2019).

O surgimento dessas substâncias é oriundo da extensiva produção industrial a fim de atender a grande demanda populacional, bem como subprodutos de atividades humanas naturais excretados por vertebrados e invertebrados (Dimpe e Nomngongo, 2016b; Xu et al., 2013). A **Figura 1** apresenta um esquema dos tipos de contaminantes, a origem desses compostos e as alterações no corpo humano que elas podem causar. Hormônios sintéticos (etinilestradiol e mestranol), ftalatos (dietilhexilftalato e dihexilftalato), pesticidas (atrazina e endossulfan) e

fenóis (bisfenol A e bisfenol S), são os mais encontrados, sejam em sistemas ambientais (água e solo) como também em alimentos.

Figura 1 - Esquema de representação dos contaminantes emergentes (CE) alvos (target) e suas principais fontes.



Fonte: Adaptado de :Geissen et al., 2015.

Devido à grande variedade de poluentes de preocupação emergente, esse trabalho se concentra em um tipo de contaminantes, pesticidas, que têm um consumo crescente, principalmente no Brasil, devido à produção agrícola realizada em larga escala.

2.1.1 Pesticidas

Os pesticidas são substâncias e agentes de processos físicos, químicos e biológicos, ou produtos naturais, utilizados desde a Grécia antiga, que possuem objetivos de inibir, combater e dificultar o desenvolvimento de microrganismos patogênicos considerados nocivos. (Matthews, 2008). Essa denominação foi amplamente utilizada para ratificar seus interesses através da consolidação de tais produtos como insumos indispensáveis.

A utilização desses compostos cresceu a fim de combater doenças endêmicas, principalmente a malária, que acometeu muitas pessoas durante as grandes guerras do Vietnã e Segunda Guerra Mundial. Em meados de 1940, ocorreu a expansão da utilização de pesticidas sintéticos, em destaque para o dicloro-difenil-tricloro-etano (DDT), que era produzido para atender a variabilidade do cultivo de alimentos (Matthews, 2008). Ao longo dos anos, a ampliação da utilização e fabricação de novos produtos foram crescentes a fim de atender o

crescimento populacional e assim, foram sendo utilizadas outras denominações como: (agrotóxicos, agroquímicos, defensivos agrícolas, praguicidas, veneno), que são empregados de acordo com a finalidade de utilização à determinadas comunidades. No Brasil, segundo a Lei Federal nº 7.802, Artigo 2, Inciso I, há a definição sobre agrotóxicos:

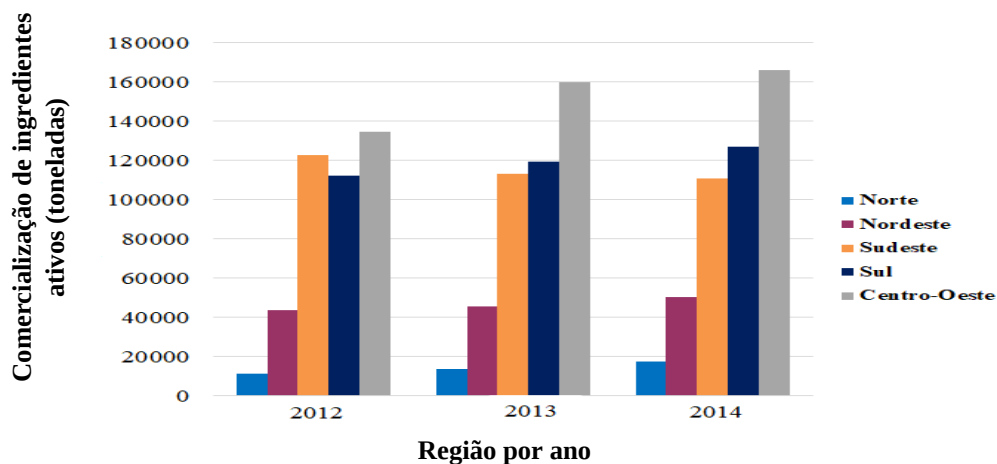
“Agrotóxicos e afins são os produtos e os componentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso no setor de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas e também em ambientes urbano, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores do crescimento.” (BRASIL, 1989)

Esses insumos fizeram parte de um “avanço tecnológico” ou modernização agrícola. Os produtos de baixo custo e legalmente comercializados no mercado trouxeram benefícios, principalmente para a agricultura, já que o agronegócio é destaque no país. Isso se deve à variabilidade de classes agronômicas, como inseticidas, acaricidas, nematicidas, fungicidas, herbicidas, reguladores de crescimento, entre outras, são cada vez mais constantes (ANVISA, 2016).

Tendo em vista que a utilização desses insumos é realizada em duas categorias: não agrícolas (utilizados em florestas nativas, outros ecossistemas, ambientes urbanos e industriais) e agrícolas (destina-se aos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos, pastagens e pecuária), é de fundamental importância a atenção para a ingestão e acúmulo desses contaminantes nos alimentos cultivados (ANVISA, 2016).

No Brasil, nos últimos anos, é crescente a autorização e comercialização de agrotóxicos. Dados do IBGE revelam que, em 2014, o estado do Mato Grosso teve maior índice de comercialização de insumos agrícolas ou afins, superando a marca de 91290,5 toneladas, seguidos de São Paulo, Rio Grande do Sul e Paraná, estados que possuem as maiores produções agrícolas. A **Figura 2** mostra uma representação gráfica, por região, da comercialização em toneladas de ingredientes ativos de agrotóxicos e afins, nos anos de 2012 a 2014 (IBGE, 2016).

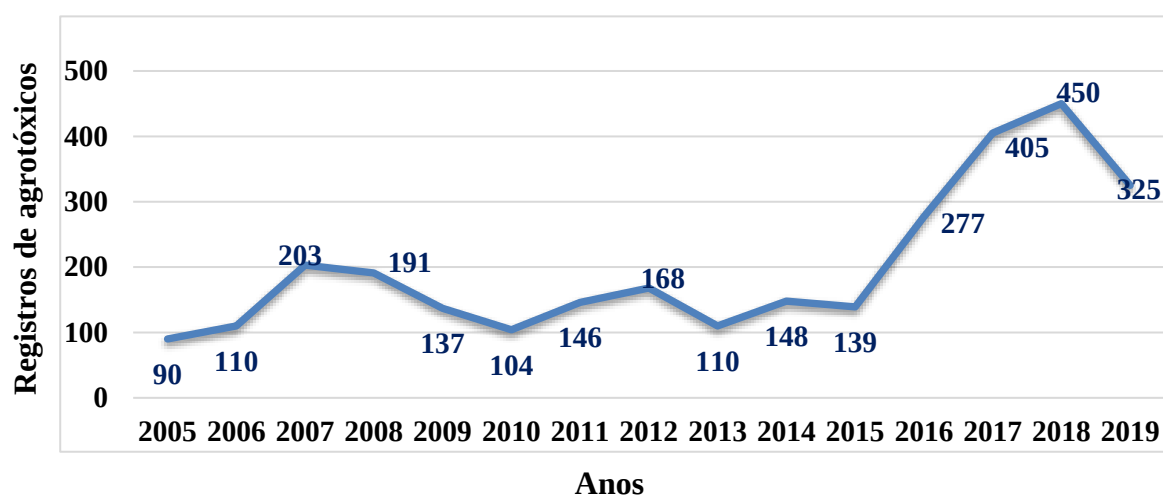
Figura 2 - Representação gráfica do consumo de agrotóxicos nos anos de 2012 a 2014 por região. Relatórios de Comercialização de Agrotóxicos - Boletim Anual de Produção, Importação, Exportação e Vendas de Agrotóxicos no Brasil.



Fonte: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA.

Diante da crescente demanda do sistema agroalimentar, vários fatores de impacto à saúde humana, devido as intoxicações ocasionadas pela exposição e desequilíbrio ambiental, **vem** repercutindo mundialmente. De fato, ao se analisar a série histórica da autorização de agrotóxicos no Brasil, segundo dados do MAPA, no período de 2005 a 2019, este último ainda em vigência, notou-se o aumento exponencial no país. A **Figura 3** mostra a grande demanda de autorização de resíduos de pesticidas (MAPA, 2018).

Figura 3 - Resumo do registro de agrotóxicos e afins no Brasil nos anos de 2005 a 2019.



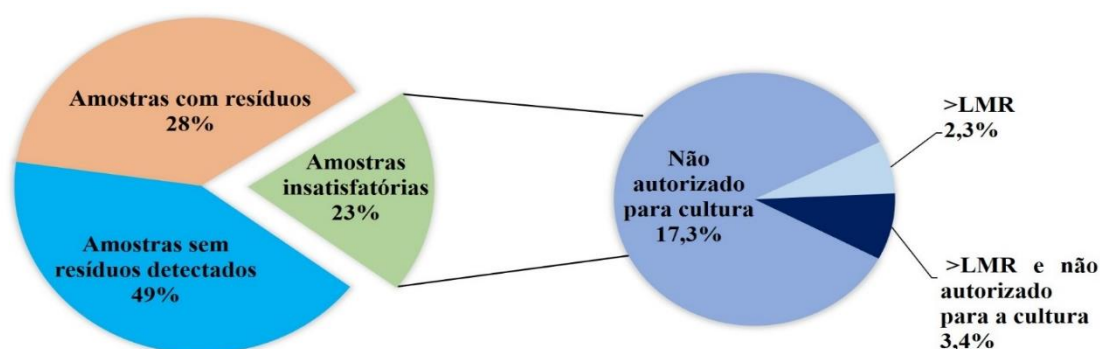
Fonte: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA.

Para controlar o consumo excessivo desses agrotóxicos, as agências nacionais e internacionais, como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), *European Commission* (EC), *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), *Food and Drug Administration* (FDA), realizam atividades de monitoramento e regulamentam os limites máximos de resíduos permitidos (LMR) para o controle de qualidade dos alimentos e água potável, embora muitas vezes não sejam cumpridos e fiscalizados (ANVISA, 2016; European Commission, 2014; FAO, 2016; FDA, 2016).

O Brasil, através da ANVISA, possui um programa de monitoramento de produtos agrícolas a fim de controlar e normatizar a utilização de agrotóxicos no país e informar os riscos iminentes relacionados à alimentação. O Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), criado em 2001, realiza o monitoramento através de análises em todas as regiões do país de diversos produtos (carnes, frutas, verduras, grãos) e representa os resultados através dos LMR's estabelecidos pela ANVISA. O impacto da exposição dos resíduos agrícolas é avaliado através do cálculo da Ingestão Diária Máxima Teórica (IDMT) em estudos toxicológicos e classificados de acordo com a ingestão diária de cada ingrediente ativo (ANVISA, 2016).

Com a finalidade de reavaliar os registros dos agrotóxicos e revisar os limites permitidos dos insumos agrícolas, o último relatório do PARA, divulgado em 2016, aponta uma preocupação com relação à presença de múltiplos resíduos em uma mesma amostra alimentar, tendo muitas vezes o uso proibido para tal cultivo: O que significa que a ANVISA regulamenta, para cada cultura o uso de insumo correto de acordo com a carga de exposição do consumidor (ANVISA, 2016). Na **Figura 4** são apresentados dados da distribuição de resíduos de agrotóxicos nas 12.051 amostras de alimentos monitorados no PARA, nos anos de 2013 a 2015.

Figura 4 - Representação do monitoramento das 4.616 amostras de alimentos.



Fonte: Adaptado de :Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, 2019.

O monitoramento do LMR é de fundamental importância para a segurança dos alimentos comercializados, com objetivo de prevenir a exposição do consumidor a esses resíduos, que estão presentes principalmente nas seguintes categorias: cereais/leguminosas, frutas, hortaliças folhosas, hortaliças não folhosas e tubérculos/raízes/bulbos. Esse parâmetro é baseado nas análises e estudos nas culturas de diversas categorias em todo o mundo, que leva em consideração a exposição esperada, baseados em parâmetros toxicológicos agudo ou crônicos. Infelizmente o uso incorreto do agrotóxico por parte do agricultor ainda é um problema, pois o acúmulo desses resíduos pode exceder no valor da concentração permitida para ingestão diária, comprometendo a segurança dos alimentos comercializados e trazendo riscos à saúde humana (ANVISA, 2016).

A utilização dos agrotóxicos pode trazer benefícios com relação ao aumento da produtividade, mas a aplicação inadequada pode resultar na acumulação desses produtos na água, solo e sedimentos, chegando aos seres humanos por meio da cadeia alimentar (Boeris et al., 2014)

Para abranger essas categorias, foi realizado nesse estudo a análise de sete resíduos de pesticidas que estão presentes nos relatórios do PARA (2010, 2011/2012 e 2013 a 2015, publicado em 2016), que apresentam algumas irregularidades com relação à autorização para as culturas ou com LMR superior aos legislados.

Os pesticidas analisados neste trabalho foram: carbendazim (CAR), tiabendazol (TBZ), fuberidazol (FBZ), carbofuran (CBF), carbaril (CBR), flutriafol (FLT) e 1-naftol (NFT), produto de degradação do carbaril. Sendo estes encontrados no uso de culturas não autorizadas entre os anos de 2010 e 2016. Ainda segundo esses relatórios as amostras escolhidas neste estudo (tomate, pimentão, alface, couve, cenoura e beterraba) são comercializadas apresentando níveis de resíduos de agrotóxicos acima do LMR, estabelecido pela ANVISA, ou utilização incorreta, o que acarreta na sobrecarga desses resíduos nos alimentos.

O último relatório do programa apresenta as amostras analisadas e os resíduos de agrotóxicos encontrados nas hortaliças alvo desse estudo. Nas amostras de cenoura, nenhum resíduo de pesticida de interesse foi encontrado. Nas amostras de alface continham carbendazim e carbofuran, não autorizados para utilização nessa cultura. Para as amostras de pimentão, das 243 analisadas, 85 continham carbendazim, 3 continham carbofuran e 1 continha flutriafol, também não autorizados no cultivo desse fruto. Nas amostras de beterraba foi detectado a presença de carbendazim, não autorizado para essa cultura. Apenas as amostras de tomates analisadas possuem resíduo de pesticidas de carbendazim e carbofuran, flutriafol autorizados,

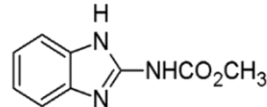
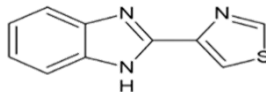
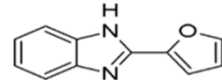
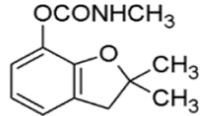
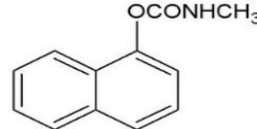
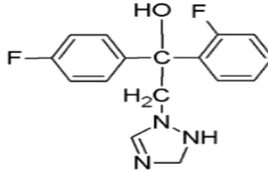
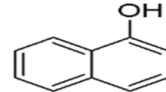
com concentrações máximas permitidas de $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$, $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ e $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente.

No Brasil, de acordo com o Decreto nº 4.074/02, que trata da inspeção e fiscalização de agrotóxicos, é de responsabilidade dos Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), Saúde e Meio Ambiente monitorar e reavaliar o registro dos resíduos de agrotóxicos e afins em produtos de origem vegetal. O monitoramento e legislação buscam novas informações que indiquem a necessidade de uma revisão de suas condições de uso, como também da não indicação do uso dos produtos registrados (BRASIL, 2002). A **Tabela 1** apresenta características dos analitos em estudo como, estrutura molecular, classificação toxicológica e culturas permitidas para cada resíduo de pesticida, de acordo com a ANVISA e *Codex Alimentarius* (Codex Alimentarius, 2018, ANVISA, 2018). Os resíduos de pesticidas de fuberidazol e 1-naftol não apresentam registros nas duas bases de dados pesquisadas. Embora o 1-naftol não seja considerado um agrotóxico ele atua como interferente endócrino. Estudos revelam que ele é produto da hidrólise do carbaril a partir de temperaturas superiores à 38°C . Essa temperatura é facilmente atingida em regiões tropicais. (Campos e Freire, 2016; Hernández et al., 2013).

É importante relatar que recentemente a Resolução RDC nº 185, de 18 de outubro de 2017, publicada no Diário Oficial da União de 19 de outubro de 2017, permite a utilização do carbouran no Brasil, apenas nas culturas de cultivo de banana, café e cana-de-açúcar, em decorrência de reavaliação toxicológica realizada pela Anvisa (BRASIL, 2018). A partir de abril de 2018 foi deliberado a proibição e banimento da utilização dessa substância em detrimento de estudos que apontam risco dietético agudo e efeitos neurotóxicos à população. O produto também tem potencial de causar toxicidade para o desenvolvimento de seres humanos, desde malformação do feto, à danos comportamentais (ANVISA, 2018).

Tendo em vista a variabilidade de produtos e subprodutos fabricados, consumidos e descartados, um grande desafio é encontrado por parte dos órgãos fiscalizadores, normatizadores e pesquisadores no monitoramento de poluentes de preocupação emergente devido as dificuldades que este tipo de análise implica, concentrações muito baixas e presença de interferentes, o que requer o desenvolvimento de métodos analíticos e estratégias que permitam a detecção e quantificação dessa grande variedade de compostos.

Tabela 1: Dados de culturas permitidas (Codex e ANVISA) e características químicas (massa molar e estrutura molecular) dos agrotóxicos em estudo.

Composto	Cultura permitida (CODEX)	Cultura permitida (ANVISA)	Classificação toxicológica *	Estrutura Molecular
Carbendazim	Alface, abacaxi, arroz, banana, beterraba, feijão, couve, cenoura, manga pepino, pimentão, soja, tomate, trigo, uva.	Algodão, arroz, feijão, maçã, milho, soja, trigo.	Classe III	
Tiabendazol	Abacate, banana, batata, carnes, ovos, manga, mamão.	Abacate, abacaxi, acelga, alface, arroz, banana, batata, cenoura, cana – de – açúcar, cebola, citro, ervilha, feijão, manga, mamão, maracujá, pimentão, soja, tomate.	Classe IV	
Fuberidazol	Não há registros	Não há registros	Classe III	
Carbofuran	Algodão, arroz, banana, beterraba, café, cana-de-açúcar, carnes, milho, semente de girassol.	Ingrediente ativo proibido no Brasil em decorrência de reavaliação toxicológica realizada pela Anvisa.	Classe I	
Carbaril	Arroz, azeitona, beterraba, batata doce, berinjela, cenoura, carne, frutas cítricas, leite, milho, pimentão, soja, semente de girassol, trigo, tomate.	Abacaxi, abóbora, algodão, alho, banana, batata, cebola, couve-flor, feijão, maçã, pepino, repolho, tomate.	Classe II	
Flutriafol	Alface, banana, beterraba, carnes, milho, morango, ovos, pimentas, soja, tomate, trigo, uva.	Abacate, abacaxi, abóbora, algodão, alho, arroz, aveia, banana, batata, batata doce, beterraba, cacau, café, cana-de-açúcar, cebola, chuchu, ervilha, feijão, girassol, maçã, mamão, manga, maracujá, melancia, milho, pepino, pimentão, pimenta, soja, tomate, trigo.	Classe III	
1 - Naftol	Metabólito	Não há registros	—	

*Classificação toxicológica (**Classe I** – Extremamente tóxico e altamente tóxico; **Classe II** – Moderadamente tóxico; **Classe III** – Pouco tóxico e improvável de causar dano agudo; **Classe IV** – sem advertência).

2.2 Cromatografia e preparo de amostras para resíduos de pesticidas

A cromatografia é uma técnica analítica que consiste na partição do soluto entre as fases móvel e estacionária. Na cromatografia líquida, a fase móvel é composta por solventes que realizam a eluição pelos sítios ativos de adsorção da fase estacionária. No processo de eluição, deslocamento do soluto pela fase móvel, utilizam-se estratégias para conseguir arrastar os analitos da fase estacionária. A estratégia principal utilizada é saber a polaridade dos solventes, pois quanto maior é a polaridade, maior é a força eluente (Harris e Lucy, 2017). Com essas características, é possível controlar a força através de uma eluição isocrática, que consiste na proporção de solvente igual do início ao fim da corrida, ou eluição gradiente, que possibilita a variação regular da força do solvente durante a corrida, de acordo com as características dos componentes (Harris e Lucy, 2017).

Outros fatores da técnica cromatográfica que contribuem para uma separação ideal dos analitos de interesse são: temperatura, tipos de colunas e vazão (Collins, 2006; Lanças 2009; Skoog, Holler, Nieman, 2002).

As cromatografias líquidas (LC) e gasosa (GC) são as técnicas mais utilizadas para a identificação e quantificação de poluentes emergentes em diversas matrizes, devido à sua capacidade de seletividade resultante da separação dos analitos. Muito embora, a primeira técnica seja mais utilizada porque muitos compostos são polares, termicamente instáveis ou não são facilmente vaporizados (Liu et al., 2017; Masiá, Blasco, Picó, 2014; Schwanz, Carpilovsky, Weis, e Costabeber, 2019; Souza Tette et al., 2016).

A cromatografia é a técnica mais utilizada na separação e quantificação de resíduos de pesticidas presentes em diversas amostras (Liu et al., 2017; Rejczak e Tuzimski, 2017; Souza Tette et al., 2016; Yang et al., 2018). Com a complexidade das matrizes, apresentando inúmeros constituintes, as tecnologias precisam ser aprimoradas. A química dos materiais trouxe novidades com relação às colunas utilizadas na fase estacionária. A fim de atingir melhores resoluções, foram sendo desenvolvidas fases estacionárias capazes de aumentar a área superficial de contato, a simetria e reprodutibilidade das partículas quimicamente modificadas (Collins, 2006; Lanças 2009).

Os detectores também foram sendo modernizados para garantir o aumento da seletividade e sensibilidade do sinal do analito de forma mais eficiente. A espectrometria de massa acoplada à cromatografia líquida (LC-MS- do inglês: *Liquid Chromatography - Mass Spectrometry*) é uma das ferramentas mais poderosas para a análise de pesticidas, em razão de sua capacidade de detectar simultaneamente analitos de diferentes grupos químicos e

termicamente instáveis (Liu et al., 2017; Rejczak, Tuzimski, 2017; Souza Tette, Guidi, De Abreu Glória, e Fernandes, 2016; Yang, Luo, Duan, Li, Liu, 2018; Alcântara et al., 2019; Konatu, Breitzkreitz, e Jardim, 2017). No entanto, devido à complexidade operacional e, principalmente, ao alto custo de manutenção, sua viabilidade é restrita para muitos laboratórios. Alternativas com outros detectores mais simples podem ser utilizados como o de Arranjo de Diodos - DAD (do inglês: *Diode Array Detector*), espectrofluorimetria molecular de excitação/emissão (LC-EEM – do inglês: *Liquid Chromatography - Excitation Emission Matrix*).

Apesar dos avanços no desenvolvimento de instrumentação analítica, uma etapa na análise de resíduos de pesticidas é muito importante, pois busca reduzir a complexidade na análise das matrizes, principalmente ambientais e alimentícias. A preparação de amostras continua sendo um passo importante para a obtenção de resultados quantitativos precisos, principalmente devido às baixas concentrações em que esses compostos geralmente são encontrados. Neste sentido, esta etapa é a primeira, a mais importante e a mais crítica, para triagens de amplo espectro e quantificação precisa de pesticidas e seus metabólitos (Alcântara et al., 2019; H. Musarurwa, L. Chimuka, V. E Pakade, 2019; Oellig e Schmid, 2019).

O preparo da amostra visa isolar e concentrar os analitos de uma matriz e deve ser escolhido baseado na compreensão dos princípios que governam a transferência de massa, dado pelo coeficiente de partição dos analitos e das propriedades físico-químicas dos constituintes da amostra como polaridade, solubilidade, estabilidade química e térmica, entre outros (Borges, Figueiredo e Queiroz, 2015; Tuzimski e Sherma, 2015).

Existem diferentes métodos analíticos desenvolvidos para extração e purificação de pesticidas. A extração líquido-líquido (LLE - do inglês: *Liquid-liquid extraction*) é a técnica mais antiga e se baseia na imiscibilidade de solventes orgânicos para particionar os analitos entre as fases utilizadas no método. Contudo, esse processo não é muito seletivo e utiliza solventes orgânicos que são desfavoráveis ao meio ambiente (Dimpe, Nomngongo, 2016).

Outras técnicas oriundas desse processo também foram sendo desenvolvidas, como é o caso da Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME- do inglês: *Dispersive Liquid-liquid Microextraction*), que consiste na mistura dos solventes extrator e dispersor orgânico, a qual é injetada na amostra aquosa para formar uma solução turva homogênea por agitação manual ou mecânica. Esta dispersão leva a um aumento significativo na superfície de contato entre o solvente extrator e a amostra, o que aumenta a eficiência da extração (Magi, Di Carro, Mirasole, Benedetti, 2018; Mansour, Danielson, 2018; Parrilla Vázquez, Ferrer, Martínez Bueno, Fernández-Alba, 2019). Esforços para superar limitações do DLLME foram sendo

superados, sendo que vários métodos foram desenvolvidos, desde agitação mecânica a agitações com vórtices, ondas ultrassônicas (Mansour, Danielson, 2018).

A extração em fase sólida (SPE - do inglês: *Solid-phase Extraction*) é a mais aplicada na extração de várias classes de poluentes emergentes em água, sendo de fácil automação e disponibilidade. No entanto, por ser uma técnica que utiliza cartuchos com partículas agregadas é necessário o bombeamento e sucção eficientes do solvente, através de alta contrapressão. Isso torna o processo demorado, impossibilitando o tratamento de grandes volumes de amostras (Farajzadeh, Yadeghari, Khoshmaram, 2017). Com esse propósito, outras técnicas foram sendo desenvolvidas a fim de minimizar os custos e tornar esse processo mais rápido.

A Microextração dispersiva em fase sólida (dSPE - do inglês: *Dispersive Solid-Phase Extraction*) também é utilizada. Consiste na adição de um solvente em um extrato (como acetonitrila) para remover as interferências da matriz, que são, então, separadas por centrifugação (Farajzadeh, Yadeghari, Khoshmaram, 2017; Picó et al., 2017).

Mais recentemente um esquema de extração de multirresíduos, conhecido como método QuEChERS, vem sendo aprimorado para análise de pesticidas em alimentos e outros produtos perecíveis (Anastassiades, Lehotay, Štajnbaher, Schenck, 2003). Esse método vem se mostrando vantajoso frente ao SPE, pois envolve uma extração única, direta, de elevada frequência analítica e baixo custo; mantendo-se de acordo com o princípio da química verde (Dimpe, Nomngongo, 2016).

O método proposto por Anastassiades e colaboradores, em 2003, foi criado a partir das limitações do método de Mills, criado em 1963, baseado na extração com acetonitrila e éter de petróleo, e na metodologia de Luke, desenvolvido em 1975, que também consistia na extração com éter de petróleo, acetona e diclorometano, para promover a partição (Anastassiades et al., 2003; González-Curbelo et al., 2015; Lehotay, De Kok, Hiemstra, Van Bodegraven, 2005; Masiá et al., 2014; Ribeiro Konatu et al., 2017). Esses tratamentos eram laboriosos, exigiam grande quantidade de amostras e utilizavam solventes tóxicos e prejudiciais ao meio ambiente.

O método QuEChERS, em sua abordagem original, foi desenvolvido a fim de melhorar a recuperação de resíduos de pesticidas na determinação em matrizes alimentares. É considerado um método oficial de análise por vários pesquisadores, tornando-se o método oficial para análise de resíduos de pesticidas (método oficial AOAC 2007.01 e método padrão CEN EN 15662), pois tem ampla aplicabilidade (pesticidas não polares ou muito polares, ácidos ou básicos) (Konatu et al., 2017; Perestrelo et al., 2019). O processo baseia-se na extração com acetonitrila devido à miscibilidade com água, que faz parte da maioria dos alimentos, o que possibilita melhor contato com os constituintes da amostra, além de possibilitar a extração de

analitos com diferentes polaridades e extração de menor quantidade de interferentes provenientes da amostra, como ceras e gorduras. Outra etapa é a de partição, promovida pela adição de cloreto de sódio (NaCl), capaz de realizar o *salting out*, e sulfato de magnésio (MgSO₄) que promove uma reação de hidratação exotérmica, favorecendo a extração de compostos apolares. Por fim, uma etapa de limpeza do extrato, empregando a extração em fase sólida dispersiva (d-SPE, do inglês: *Dispersive Solid phase Extraction*), PSA (do inglês: *Primary Secondary Amine*), octadecilsilano (C18) ou carbono grafitizado (GCB – do inglês: *Graphitized Carbon Black*); que atuam como removedores de co-extraívos interferentes (Alcântara et al., 2019; Anastassiades et al., 2003; González-Curbelo et al., 2015; Konatu et al., 2017; Perestrelo et al., 2019).

Além disso, técnicas com Nanopartículas magnéticas – MNPs (do inglês: *Magnetic nanoparticles*), baseados em nanotubos de carbono, grafeno e outros agentes magnéticos, bem como suas formas funcionalizadas, vêm sendo exploradas devido à alta capacidade de adsorção de compostos orgânicos (Li, Chen, Shi, 2015; Picó et al., 2017).

Mesmo com etapa de extração é possível ainda encontrar a presença de interferentes na matriz. Esses componentes interferentes podem ser co-extraídos e podem afetar negativamente a análise cromatográfica (Perestrelo et al., 2019).

Alternativas para esses problemas podem ser solucionadas através do acoplamento da técnica QuEChERS com outras técnicas de preparação de amostras. Contudo, isso pode se tornar laborioso, ou pode ser através da utilização de ferramentas quimiométricas que aproveitam todas as informações instrumentais, conseguindo abranger as vias das gerações de dados (Ahmadvand, Parastar, Sereshti, Olivieri, e Tauler, 2017; Arancibia et al., 2012; Escandar et al., 2014). Diante das limitações das técnicas cromatográficas, a abordagem da utilização de ferramentas quimiométricas serão discutidas a seguir.

2.3 Quimiometria

Há alguns anos, a quimiometria ganhou aceitação devido à necessidade de estudar amostras cada vez mais complexas e, principalmente, atender a modernidade da instrumentação, que fornece conjuntos grandes e complexos de dados. Sem o auxílio de técnicas quimiométricas, seria difícil extrair informações analíticas úteis e interpretáveis no campo da química, áreas farmacêutica, nutricional, medicinal e todas as áreas que buscam conhecimento sobre a composição e análises (Ahmadvand et al., 2017; Arancibia et al., 2012; Escandar et al., 2014; Jalalvand, Goicoechea, Rutledge, 2017; Olivieri, Escandar, 2000).

Felizmente, há uma variedade de técnicas adequadas que auxiliam no tratamento de dados que envolve diversos campos da pesquisa como planejamento e otimização de experimentos, análise exploratória de dados, classificação, calibração univariada, multivariada e parâmetros de desempenho analítico (Escandar et al., 2014; Ahmadvand et al., 2017).

Na química analítica, em geral, o principal objetivo é construir um modelo de calibração que estabelece uma relação entre os valores das quantidades fornecidas por amostras padrões, aos sinais instrumentais (correlacionadas com as propriedades físico-químicas) permitindo associá-los às respostas desejáveis (Escandar et al., 2014; Jalalvand et al., 2017; Kościelniak e Wieczorek, 2016). No entanto, os efeitos de interferência podem causar alterações na intensidade do sinal analítico da substância, sendo necessário a utilização de outras ferramentas quimiométricas para superar essa adversidade (de la Peña et al., 2015).

Mesmo quando se utiliza dos recursos quimiométricos é preciso saber a complexidade da amostra e quais os tipos de dados gerados pela instrumentação analítica utilizada. Diante dessa grande variedade, hoje, os dados podem ser classificados como dados de primeira, segunda, terceira e quarta ordem, onde esse termo se refere justamente ao arranjo de dados obtidos por determinados número de modos (Arancibia et al., 2012; Escandar et al., 2014).

Na calibração univariada, ou ordem zero, uma grandeza instrumental é correlacionada com a concentração do analito, produzindo uma única resposta por amostra, como absorbância, único comprimento de onda ou pH. Embora muito utilizada, a complexidade da amostra pode trazer alguns inconvenientes, como a presença de interferentes, comprometendo a seletividade do sensor empregado nas medidas (Arancibia et al., 2012; de la Peña et al., 2015; Escandar et al., 2014, 2007; Jalalvand et al., 2017; Olivieri, 2014).

Na calibração de primeira ordem, a amostra é disposta como um vetor e um único instrumento registra matrizes com duas vias para uma única amostra como espectrofotometria UV-Vis, infravermelho próximo (NIR - do inglês: *near infrared*), ressonância magnética nuclear, entre outros (Kościelniak e Wieczorek, 2016).

Devido a não seletividade instrumental, a presença de constituintes inesperados pode ser tratada como uma interferência, caso estejam contribuindo no sinal do analito, ou podem ser inseridos no conjunto de dados. Nesse caso, para a construção do modelo é necessário uma grande quantidade de amostras para que seja possível abranger todos os interferentes.

Os dados de segunda ordem podem ser obtidos acoplando-se dois instrumentos de primeira ordem, onde cada um fornece um modo ou uma dimensão, como por exemplo, a cromatografia seguida por detecção baseada na absorção UV-Vis, espectrometria de massa, espectrofluorímetro (excitação e emissão), cromatografia a gás com detector de massa (CG-MS

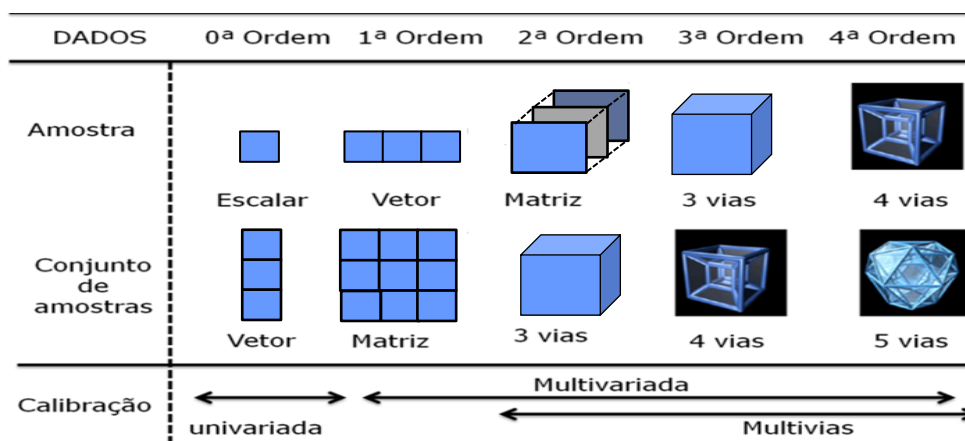
- do inglês: *Gas Chromatography – Mass Spectrometry*) ou cinética de degradação de uma reação monitorada por espectrometria UV-Vis (Arancibia et al., 2012; de la Peña et al., 2015; Escandar et al., 2014; Kościelniak, Wieczorek, 2016).

Nos dados de terceira ordem, tem-se a introdução de mais um modo de obtenção dos dados e assim temos um conjunto de amostras com quatro vias, a exemplo pode-se citar a junção de mais um instrumento de detecção ou separação, como a cromatografia líquida bidimensional com detector de arranjo de diodos (LC-LC-DAD – do inglês: *Two-Dimensional Liquid Chromatography with Diode Array Detection*) (Arancibia et al., 2012; de la Peña et al., 2015; Escandar et al., 2014, 2007; Olivieri e Escandar, 2000). A introdução de dimensões gera tensores com três, quatro ou cinco vias. Terminologia que explica como os algoritmos organizam os dados de acordo com a ordem e as amostras.

Na **Figura 5** observa-se as formas de obtenção dos dados para uma amostra ou para um conjunto de amostras. Ordem zero, representado por um escalar, primeira ordem (vetor), segunda ordem (matriz), terceira ordem (matriz tridimensional), até ordens mais elevadas que fornecem um tensor com várias vias (*N-way*).

A calibração de multivias (segunda ordem ou superior) pode contornar a presença de interferências que não estão incluídas no conjunto de calibração, permitindo estimar com exatidão as concentrações dos constituintes de interesse. Essa propriedade é conhecida como “vantagem de segunda ordem”, e vem mostrando um imenso potencial na análise de múltiplos constituintes, tornando-se um alvo em pesquisas teóricas e experimentais (de la Peña et al., 2015; Escandar et al., 2014; Wu, Nie, Yu, e Yu, 2009).

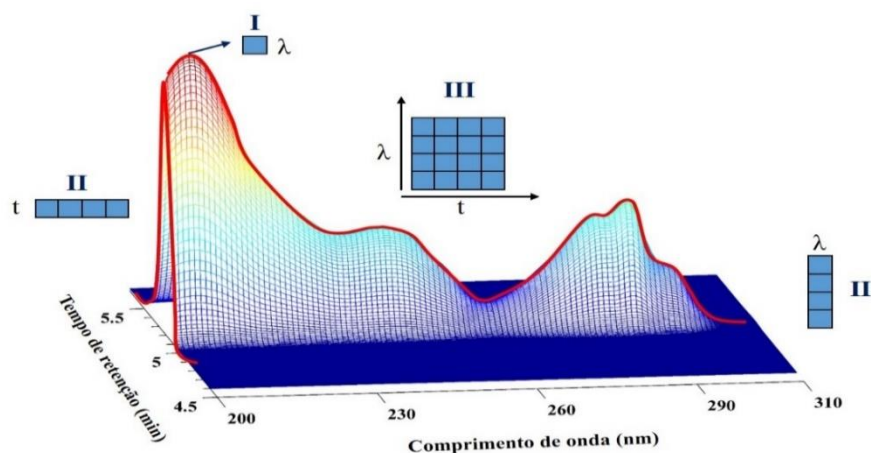
Figura 5 - Representação dos modos de obtenção dos dados para uma amostra e para um conjunto de amostras.



Fonte: Adaptado de : de la Peña et al., 2015; Escandar et al., 2014; Jalalvand et al., 2017.

No caso de dados cromatográficos, quando se trata de amostras complexas que resistem a esforços na separação, não se conseguindo bandas resolvidas através de ajuste de pH, mudanças de proporções de solventes, preparo de amostra, sistemas de detectores, entre outras formas de garantir a seletividade no sinal, utilizam-se ferramentas quimiométricas, que possibilita repostas multilíneas capazes de resolver essas interferências. A **Figura 6** mostra a representação dos tipos de dados gerados através de um cromatograma de carbendazim em 3D, obtido por um sistema LC-DAD, onde é possível identificar a ordem gerada por esse sistema: ordem zero, primeira ou segunda ordem e assim consecutivamente quando se adiciona outros modos à matriz.

Figura 6 - Representação do cromatograma em 3D obtido por um sistema LC-DAD e suas formas de obtenção dos dados. I) ordem zero, onde uma grandeza é correlacionada com a concentração do analito em um determinado comprimento de onda e tempo de retenção; II) primeira ordem, obtém-se um vetor dados, fixando um comprimento de onda e varrendo todo o cromatograma no tempo de retenção, ou fixando um tempo e varrendo todo o espectro; III) segunda ordem, uma matriz de dados.



Fonte: Autora

Diante da vasta possibilidade de técnicas quimiométricas para o processamento dos dados, a escolha de uma técnica para a geração do modelo deve ser realizada através da natureza dos dados gerados, devendo, a princípio, considerar-se a relação de multilinearidade nos casos de ordem superior. Com isso é possível escolher ferramentas específicas capazes de influenciar significativamente os perfis recuperados dos constituintes e as figuras de mérito obtidas (Escandar et al., 2014; Olivieri, 2014).

2.3.1 Multilinearidade

A calibração multilinear está ganhando atenção no campo da ciência analítica devido a separação matemática de análises quantitativas de analitos de interesse e interferentes não calibrados presentes em amostras complexas. Dessa forma, é importante que a escolha do algoritmo seja orientada pelas propriedades dos dados instrumentais gerados.

Os dados de segunda ordem são organizados em matrizes de dados com três vias, gerando, a princípio, uma função linear de concentrações e perfis de dados trilineares (2º ordem). Na **Equação 1** tem-se a representação matemática do modelo trilinear:

$$X_{ijk} = \sum_{n=1}^N a_{in} b_{jn} c_{kn} + e_{ijk} \quad \text{Eq. (1)}$$

A exemplo dos perfis cromatográfico e espectral na região UV-Vis, podemos inferir que na equação, **a** representa o perfil de concentração relativa de um constituinte até a enésima amostra, conhecido como score; **b** e **c** são os canais instrumentais; *j* e *k*, aos perfis cromatográficos e espectral, respectivamente, e *e*, o erro residual, e que tem as mesmas dimensões que X (Arancibia et al., 2012; de la Peña et al., 2015; Escandar et al., 2014; Jalalvand et al., 2017).

O conceito de trilinearidade está associado matematicamente à possibilidade de a resposta instrumental estar representada pelo produto de três vetores independentes, que satisfazem a **Eq. 1**, e remete à uma solução única quando processados com alguns algoritmos, como por exemplo, análise de fatores paralelos – PARAFAC (do inglês: *PARAllel FACtor analysis*), que tem a característica de contornar a ambiguidade rotacional, comum de ocorrer em modelos bilineares.

Outros algoritmos que processam dados trilineares são: SWATLD (do inglês; *self-weighted alternating trilinear decomposition*), BLS (do inglês: *bilinear least-squares*, entre outros (Ahmadvand et al., 2017; Arancibia et al., 2012; de la Peña et al., 2015; Escandar et al., 2014)

Alguns métodos instrumentais são responsáveis por apresentar mudanças nos perfis de uma amostra para outra, variando posições e forma. Tratando-se de dados multilineares, a variação desses perfis ocasiona a quebra da trilinearidade; essas mudanças no arranjo de três vias de uma matriz **X** ($I \times J \times K$) originam uma matriz bilinear.

Nos dados de LC-DAD, a quebra da trilinearidade ocorre devido às variações dos perfis cromatográficos, que não são reprodutíveis de uma injeção para outra, podendo ocorrer além do deslocamento o alargamento de pico, devido as interações que os analitos tem com a coluna, como discutido anteriormente. Nesses casos, ocorre a dependência dos perfis espectrais com os índices de amostras. O que ocasiona a quebra da trilinearidade, que requer a descrição do comportamento de cada constituinte nos dois modos instrumentais independentes (Monzón, Teglia, Delfino, Goicoechea, 2018; Pellegrino Vidal, Allegrini, Olivieri, 2017; Tajabadi, Ghambarian, Yamini, Yazdanfar, 2016; Vosough e Tehrani, 2018).

Existem duas estratégias para contornar os desvios da trilinearidade: a primeira é restaurar a multilinearidade dos dados com algoritmos capazes de realizar o alinhamento ou sincronização dos cromatogramas - correção que deve ser realizada antes do processamento dos dados e consiste na compressão ou alongamento dos dados até a correspondência de uma amostra de referência; a segunda maneira é a realização do processamento dos dados com algoritmos que permitam essa variação do tempo de retenção, como com Resolução de curvas multivariadas com Mínimos Quadrados Alternados (MCR-ALS – do inglês: *Multivariate Curve Resolution – Alternating Least Square*), Análise de Fatores Paralelos 2 (PARAFAC2- do inglês: *PARAllel FACtor Analysis 2*) e Mínimos Quadrados Parciais Desdobrados (U-PLS – do inglês: *Unfold - Partial Least Square*, este último não muito aplicado quando as variações de tempo de retenção são pronunciadas (Monzón et al., 2018; Mortera, Zuljan, Magni, Bortolato, Alarcón, 2018; Pellegrino Vidal et al., 2017; Pérez-Outeiral, Elcoroaristizabal, Amigo, Vidal, 2017; Tajabadi et al., 2016; Vosough e Mojdehi, 2011).

Outros tipos de dados são os não bilineares, como é o caso da espectrometria de massa (MS-MS), onde um fragmento de massa dependente da posição no modo subsequente, levando esses dados a não produzir modos com três vias (Escandar et al., 2014).

Dados de ordem maior, como os de terceira ordem, que são obtidos a partir de um conjunto de dados de quatro vias, podem ser gerados e definidos como uma extensão do modelo trilinear, com a adição de um quarto modo.

Da mesma forma que ocorre com os dados de segunda ordem, a quebra da multilinearidade também pode ocorrer para esses dados de quatro vias. O caso de dependência de um modo para outro contribui na quebra da multilinearidade, um fenômeno comum em dados cromatográficos bidimensionais, como CG-CG-MS ou LC-LC-DAD (Escandar et al., 2014; Olivieri, 2014).

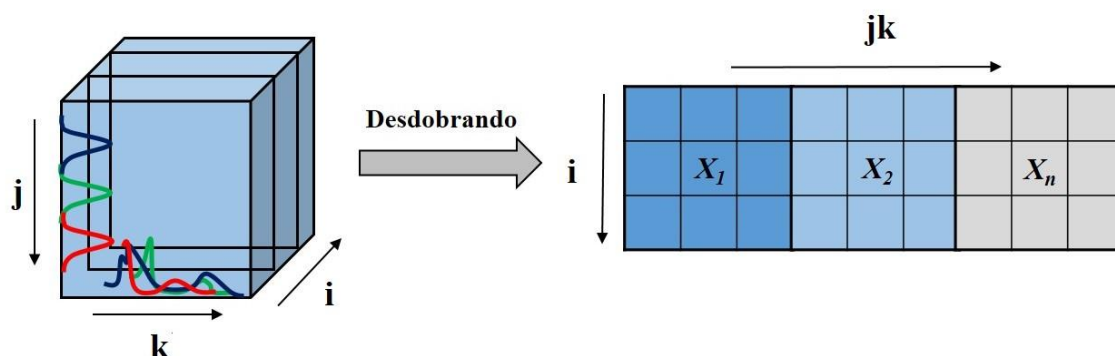
2.4 UPLS - RBL

O algoritmo U-PLS é utilizado para o processamento de dados multilíneares através do desdobramento da matriz de dados em vetores. É uma versão estendida da regressão por Mínimos Quadrados Parciais – PLS (do inglês: *Partial Least Squares*) utilizado em dados de primeira ordem (Alfarhani, Al-Tameemi, Goicoechea, Barbosa, Campiglia, 2018; de la Peña et al., 2015; Monago-Maraña, Guzmán-Becerra, Muñoz de la Peña, Galeano-Díaz, 2018; Monzón et al., 2018; Mortera et al., 2018; Olivieri e Escandar, 2000; Rejczak e Tuzimski, 2017). Contudo, não consegue alcançar a “vantagem de segunda ordem” quando interferentes estão presentes na amostra de teste, mas não estão presentes no conjunto de calibração.

Para contornar essa adversidade e realizar a análise dos dados de segunda ordem, desenvolveu-se um procedimento matemático, chamado de bilinearização residual (RBL – do inglês: *Residual Bilinearization*), que consegue modelar os resíduos da amostra de teste como uma soma das contribuições bilineares dos componentes inesperados (Bortolato, Arancibia, Escandar, e Olivieri, 2010; de la Peña et al., 2015; Olivieri e Escandar, 2000).

No primeiro passo de calibração dessa ferramenta quimiométrica, um tensor de dados com dimensões ($i \times j \times k$) é desdobrado em uma matriz bidimensional ($i \times jk$), onde i representa o número de amostras, j a dimensão correspondente ao tempo de eluição e k a dimensão dos comprimentos de onda, no caso de dados cromatográficos. Com todos os dados de calibração desdobrados, uma nova matriz é construída dispondo-as umas adjacentes às outras para a aplicação da regressão U-PLS. Na Figura 7 é representado o esquema para o desdobramento do tensor para um conjunto de amostras.

Figura 7 - Esquema de desdobramento e construção do modelo UPLS. Tensor tridimensional desdobrado e representado por um cubo de dados ($i \times jk$).



Fonte: Adaptado de: Juan et al., 2015; Komsta et al., 2018; Março et al., 2014.

Após essa etapa, o produto de duas matrizes é obtido através da validação cruzada obtendo os valores dos parâmetros do modelo $\mathbf{P}$ e $\mathbf{T}$, que são as matrizes de peso e scores, respectivamente, estimados por algoritmo iterativo capaz de explicar a maior variabilidade dessa matriz criada, com os valores de concentrações nominais de acordo com a **Equação 2**.

$$\mathbf{X}_{\text{PLS}} = \mathbf{P}\mathbf{T}^T + \mathbf{E}_{\text{PLS}} \quad \text{Eq. (2)}$$

Na sequência, uma vez obtido o número de variáveis latentes adequados e estimados pelo modelo, é feita a estimativa da concentração do analito (y) a fim de encontrar um vetor de regressão ($\mathbf{v}$) com menor resíduo. Essa etapa é feita através do produto entre o vetor dos scores ($\mathbf{t}$), obtido pela projeção da matriz desdobrada para uma amostra teste definido pelos pesos do modelo PLS e o vetor de regressão. Na **Equação 3** é apresentada como é empregada essa estimativa da concentração do analito.

$$y = \mathbf{v}^T \mathbf{t} \quad \text{Eq. (3)}$$

Contudo, isso só ocorrerá se os constituintes das amostras de teste forem adequadamente modelados pelo UPLS e não apresentarem nenhum interferente. Caso ocorra a presença de constituintes inesperados, a etapa de RBL é realizada na matriz de resíduos de cada amostra e uma nova matriz é remontada e decomposta através do SVD (do inglês: *Single Value Decomposition*), até obtenção de um valor de resíduo próximo ao de calibração, realizado na etapa PLS. A função do RBL é modelar os resíduos e apresentar resultados das amostras de teste livres de interferentes, ajustando os valores da matriz de escores com a informação do interferente modelado à parte pela etapa do RBL. A modelagem completa do UPLS-RBL é apresentada na **Equação 4**:

$$\mathbf{X}_u = \mathbf{P}\mathbf{t}_u^T + \mathbf{B}_u\mathbf{C}_u^T + \mathbf{E}_u \quad \text{Eq. (4)}$$

Na expressão, $\mathbf{P}\mathbf{t}_u$ representa a matrizes de pesos e scores do analitos, onde $\mathbf{P}$ é mantido constante e $\mathbf{t}_u$ varia até que a norma do erro de decomposição seja minimizada; $\mathbf{B}_u\mathbf{C}_u$ é a contribuição dos interferentes presentes na amostra, obtido através da decomposição por valores singulares (SVD - do inglês: *Singular Values Decomposition*) da matriz de resíduos; $\mathbf{E}_u$ é o resíduo aleatório minimizado.

Após a convergência, os valores obtidos para t_u são utilizados para estimar a concentração da amostra pela relação expressa na **Eq. 3**.

2.5 MCR - ALS

O MCR-ALS é o algoritmo bilinear de resolução de curvas multivariadas por Mínimos Quadrados Alternados (do inglês: *multivariate curve resolution-alternative least square*), desenvolvido com o objetivo de resolver dados provenientes de processos ou medidas analíticas, principalmente dados espectrocópicos, devido à similaridade do modelo com a lei de Beer-Lambert. Atualmente existem diversas aplicações em dados complexos que não envolve apenas esse campo, mas que envolve a recuperação de perfis de concentração, imagens (pixels) (Pérez e Escandar, 2014; Ruckebusch, Blanchet, 2013).

Esse algoritmo é utilizado para o processamento de dados *multivias* e tem por finalidade deconvoluir curvas, ou seja, remontar a matriz através de contribuições individuais de um dado número de perfis recuperados acrescido de um resíduo aleatório (Arancibia et al., 2012; Escandar et al., 2014; Olivieri, 2014; Olivieri e Escandar, 2000; Ruckebusch e Blanchet, 2013; Santos Sousa, Pinto, Cesar Ugulino de Araujo, 2017; Tauler, 1995; Zhao, Yuan, Chen, Li, Pu, 2018).

É descrito por um método iterativo que visa à decomposição de uma matriz de dados em um modelo bilinear, que permite encontrar os perfis de concentração e espectrais individualmente, de forma a se obter a melhor variância dos dados, podendo ser expresso matematicamente por:

$$D = CS^T + E \quad \text{Eq. (5)}$$

Da **Eq 5**, tem-se: D , uma matriz de resposta instrumental ($j \times k$), C , a matriz de concentração relativa de tamanho $j \times i$, a matriz dos espectros puros de tamanho $i \times k$ e E , uma matriz de resíduos ($j \times k$); sendo j o tempo de retenção (para dados cromatográficos), k , o comprimento de onda e n o número de amostras (para $n > 1$).

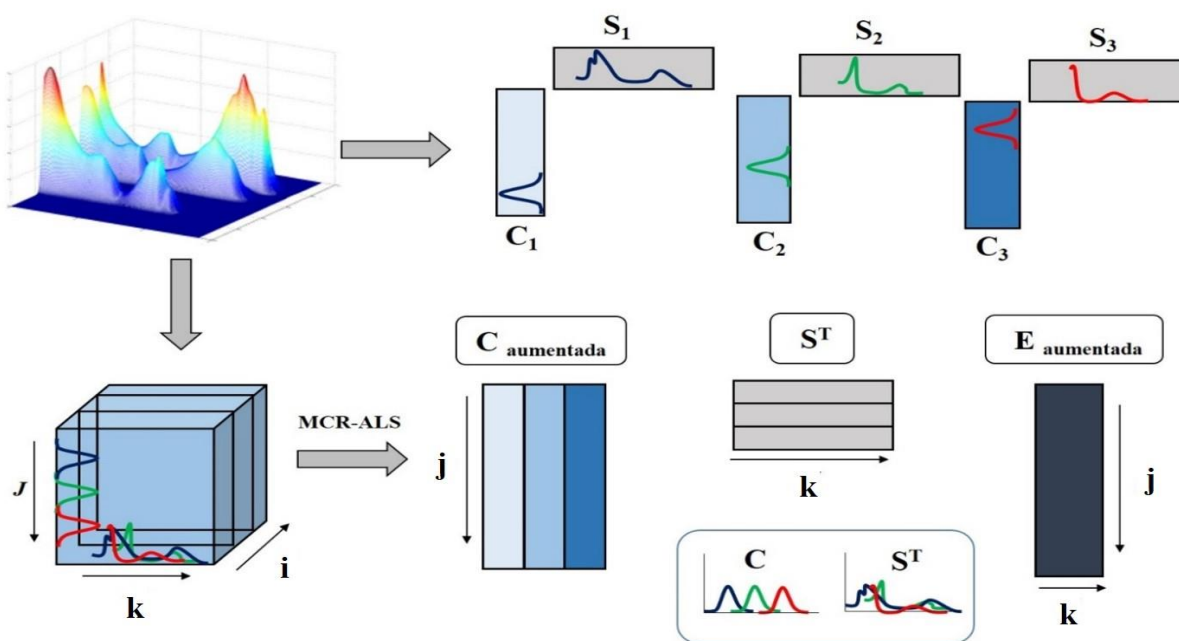
Esta ferramenta tem como princípio básico identificar as principais fontes de variação de um determinado conjunto de dados através da estimativa do número de espécies presentes na amostra e dos perfis de concentração e espectral fornecidos para cada constituinte (Jaumot, de Juan, Tauler, 2015; Komsta, Heyden, Joseph, 2018; Março, Valderrama, Alexandrino, Poppi, Tauler, 2014; Tauler, 1995).

Antes da inicialização do MCR, o conjunto de dados é decomposto em uma matriz aumentada, de forma que ao concatená-las uma abaixo da outra no modo dos cromatogramas ou dos espectros, dependendo do modo onde ocorre a quebra da trilinearidade.

No caso de dados cromatográficos, com tempo de retenção não constante de uma amostra para outra, tem-se a quebra da trilinearidade nesse modo, assim na **Figura 8** é representado esquematicamente o procedimento de decomposição do MCR-ALS em perfis de uma matriz aumentada, oriunda de um tensor tridimensional com quebra de trilinearidade (Komsta, Heyden, Joseph, 2018).

O MCR não requer muitos pré-requisitos sobre a identidade química dos componentes, contudo, após obtenção de uma matriz aumentada, é necessário avaliar o número adequado de componentes puros do sistema através da variância explicada pela decomposição de valores singulares – SVD (do inglês: *Single value decomposition*), que fornece meios para descrever os dados com vetores ortogonais e esses valores devem ser significativamente maior do que o valor associado ao ruído. Caso isso não ocorra, a estimativa da componente pode-se tornar uma tarefa não tão fácil, podendo atribuir erros ao modelo das espécies envolvidas na amostra (Jaumot et al., 2015; Março et al., 2014; Ruckebusch e Blanchet, 2013; Tauler, 1995).

Figura 8 - Esquema de geração de uma matriz aumentada e decomposição com o MCR- ALS. Tensor tridimensional aumentado, representado por um cubo de dados ($i \times j \times k$), e decomposto em C aumentada ($i \times j$), contendo os perfis cromatográficos puros de cada constituinte presente na matriz, nesse caso tem-se $i=3$, S^T ($i \times k$), representa os perfis espectrais de cada constituinte da matriz, $E_{\text{aumentada}}$ ($i \times k$) são os resíduos de decomposição, onde, i representa o número de amostras, j os tempos de eluição e k os comprimentos de onda para cada amostra.



Fonte: Adaptado de :Juan et al., 2015; Komsta et al., 2018; Março et al., 2014.

Após a escolha do número de componentes, o MCR inicializa a otimização por um algoritmo de seleção de variáveis puras com base no método de detecção de variáveis semelhante ao SIMPLISMA (do inglês: *Simple-to-use interactive self-modeling mixture analysis*) ou pela análise evolucionária de fatores (EFA- do inglês: *Evolving Factor Analysis*), que recupera o perfil puro com base na evolução do sinal (Jaumot et al., 2015; Março et al., 2014; Ruckebusch e Blanchet, 2013).

Para o ajuste do modelo, são feitas as iterações até o critério de convergência, que ocorre quando a variação do perfil obtido entre iterações consecutivas é igual ou menor que 0,1% na variação do desvio padrão. Duas etapas, expressas nas **Equação 6** e **7**, são utilizadas na etapa de iteratividade de C e S^T pelo ALS:

$$C = D S (S^T S)^{-1} \quad \text{Eq. (6)}$$

$$S^T = (C^T C)^{-1} C^T D \quad \text{Eq. (7)}$$

Devido o algoritmo ser descrito por um modelo bilinear, alguns problemas podem ocorrer: ambiguidade rotacional, resultando em soluções matemáticas não únicas, como ocorre com dados trilineares, deficiência de posto e estimativa de mais um perfil, relacionado à linha de base presente nos dados. No entanto, para reduzir a ambiguidade rotacional, é possível aplicar restrições durante o cálculo iterativo do ALS, a fim de obter uma solução quimicamente interpretável correlacionada com os dados originais. Dentre as restrições, pode-se citar (Arancibia et al., 2012; Juan et al., 2015; Komsta et al., 2018; Pérez e Escandar, 2014; Ruckebusch e Blanchet, 2013):

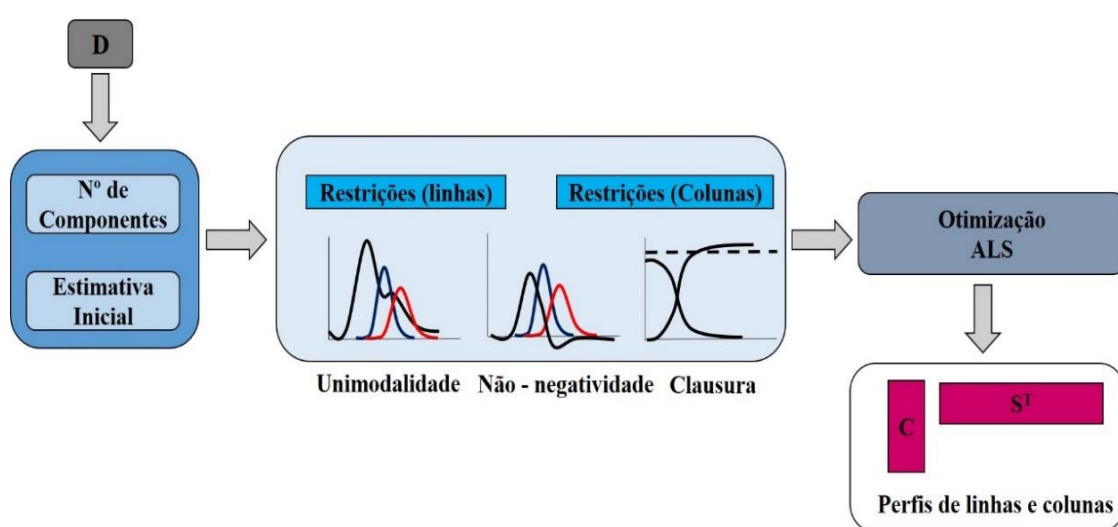
- ✓ Não negatividade: relacionada a não nulidade e positividade dos perfis. Geralmente aplicada aos perfis de concentração e espectrais;
- ✓ Unimodalidade: é uma restrição que permite a presença de um único máximo por perfil. É a condição preenchida pelos perfis de eluição na análise de execuções cromatográficas (sinais em forma de pico);
- ✓ *Closure*: que está relacionada ao estado do balanço de massa. Limita que a resposta esteja em um valor estimado;
- ✓ Trilinearidade: consiste em submeter os perfis espectrais e de concentração a não variação entre uma amostra ou outra e unicidade na resposta;

- ✓ Normalização: auxilia na correção de ambiguidade de intensidade e posição, possibilitando diferentes perfis com altura máxima igual ou área igual;
- ✓ Correlação: constrói uma curva de calibração univariada internamente a partir dos valores de concentração calculados pelo MCR e os valores de referência a fim de prever posteriormente novos valores de concentração em amostras futuras;
- ✓ Correspondência entre as espécies: essa restrição é utilizada quando várias matrizes de dados diferentes são processadas juntas a fim de obter a correspondência entre a presença ou ausência de componentes presentes em uma determinada amostra.

Embora o MCR consiga modelar os dados a fim de obter resultados positivos, otimizando-os especificamente para um tipo de dado em questão, esse método requer um conhecimento maior do modelo e das restrições disponíveis, não se tornando uma tarefa prática e rápida (de la Peña et al., 2015; Escandar et al., 2014; Jaumot et al., 2015; Juan et al., 2015; Março et al., 2014; Ruckebusch e Blanchet, 2013).

Após a otimização dessas etapas, um ajuste linear é construído entre I amostras de calibração e a área sobre o perfil de concentração aumentado da matriz. Resulta em uma curva de calibração pseudounivariada que possibilita encontrar o valor de concentração do analito através da interpolação da área do perfil recuperado nessa curva (Arancibia et al., 2012; de la Peña et al., 2015; Escandar et al., 2014). O esquema mostrado na **Figura 9** apresenta as etapas do MCR, bem como o funcionamento de algumas restrições impostas para a solução dos dados.

Figura 9 - Fluxograma de representação do ajuste feito por três restrições na etapa de otimização do MCR-ALS.



Fonte: Adaptado de: Jaumot et al., 2015.

Diante dos conhecimentos dos modelos quimométricos e da instrumentação cromatográfica, é possível obter resultados satisfatórios ao associá-las, sendo possível a validação da metodologia que, por muitas vezes, fica comprometida pela complexidade da matriz ou limitações do detector.

2.6 Parâmetros de desempenho analítico

Na química analítica muitas decisões importantes são baseadas em resultados que indicam a qualidade do trabalho realizado, isto é, o quanto se pode confiar nesses resultados e o que pode ser melhorado diante dessa avaliação.

A validação vem testar a qualidade e a capacidade preditiva de um modelo de calibração, sendo uma etapa imprescindível em todas as análises quantitativas. Existem órgãos normalizadores, nacionais e internacionais que regulam e estabelecem estudos sistemáticos que certificam que o método atende ao propósito previsto. O Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), American Society for Testing and Materials (ASTM), EURACHEM, representam algumas das organizações (INMETRO 2003; ASTM, 2000; EURACHEM, 2014).

Diante disso, são avaliados parâmetros que caracterizam a eficiência do método e são denominados de figuras de mérito, ou parâmetros de desempenho, sendo as principais: exatidão, precisão, sensibilidade, seletividade, linearidade, razão sinal/ruído, limite de detecção – LOD (do inglês: *limit of detection*), limite de quantificação – LOQ (do inglês: *limit of quantification*), robustez, intervalos de confiança, teste para erros sistemáticos, extensão da faixa de trabalho ou faixa linear dinâmica (Allegrini e Olivieri, 2018; Olivieri e Escandar, 2000; Valderrama e Braga, 2009).

O LOD e o LOQ são parâmetros populares que expressam a menor quantidade da espécie de interesse, que pode ser detectada por um instrumento, e a menor concentração do analito, em determinadas condições. Esses descritores de qualidade permitem comparar diferentes metodologias, pois são expressos em unidades de concentração. No entanto, a base dessas definições está na sensibilidade, que também é um parâmetro chave (Allegrini e Olivieri, 2018; de la Peña et al., 2015; Valderrama e Braga, 2009). As Equações 8 e 9 expressam o cálculo para obtenção do LOD e LOQ,

$$\text{LOD} = 3,3 \times \frac{S_{\text{ruído}}}{\text{SEN}} \quad \text{Eq. (8)}$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \frac{S_{\text{ruído}}}{\text{SEN}} \quad \text{Eq. (9)}$$

onde $S_{\text{ruído}}$ é uma estimativa do ruído instrumental, que pode ser obtida pelo desvio padrão de um conjunto de dados sem a presença de nenhum constituinte (branco) ou através dos resíduos de decomposição do modelo. As constantes 3,3 e 10 correspondem a probabilidade de erros à 95% de confiança das curvas gaussianas (Olivieri e Escandar, 2000).

Na calibração univariada, a sensibilidade é dada pela capacidade de um método ou instrumentação discriminar pequenas diferenças de concentração, isso é determinado pela inclinação (coeficiente angular) de uma curva de calibração. Na calibração multivariada, infelizmente, a definição de sensibilidade se torna mais complexa porque pode ocorrer sobreposição de sinais de outros constituintes. Por isso deve ser levado em consideração a especificidade de cada analito (Allegrini e Olivieri, 2018; de la Peña et al., 2015; Março et al., 2014; Olivieri, 2014; Olivieri e Escandar, 2000).

Primeiramente foi proposto a estimativa da sensibilidade (SEN), baseada no conceito de sinal analítico líquido – NAS (do inglês: *Net Analyte Signal*), fundamentada na remoção da contribuição do interferente através da projeção ortogonal ao sinal instrumental (analítico). Contudo, esse conceito funciona com vetores, o que não ocorre no caso de dados de ordem superior, porque envolve matrizes (de la Peña et al., 2015; Olivieri, 2014; Olivieri e Escandar, 2000).

Atualmente existe uma abordagem, conhecida como propagação de erros, desenvolvida por Olivieri e colaboradores, que considera medir o grau de ruído de saída de um determinado sistema para um determinado ruído de entrada (Allegrini e Olivieri, 2018; de la Peña et al., 2015; Olivieri, 2014; Olivieri e Escandar, 2000).

Essa abordagem da sensibilidade pode ser vista como um problema quando for utilizada para comparar diferentes metodologias, pois depende do tipo de sinal medido. Para contornar esse problema, a sensibilidade analítica (g), que é dada como a razão entre sensibilidade e ruído instrumental, expressa matematicamente na **Equação 10**:

$$g = \frac{\text{SEN}}{s_x} \quad \text{Eq. (10)}$$

Outro parâmetro utilizado para analisar a performance da ferramenta quimiométrica é a exatidão, obtida para comparar as médias de dispersão entre os valores estimados e os valores

de referência, definido através da raiz quadrada do erro médio de previsão – RMSEP (do inglês: *Root Mean Squares Error of Prediction*), descrito na **Equação 11**:

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad \text{Eq. (11)}$$

Onde y_i e $\hat{y}_i$, são as concentrações reais e previstas, respectivamente, e n , o número total de amostras do conjunto de teste.

2.7 Alinhamento de pico em dados cromatográficos

A situação ideal para a cromatografia é dada quando ocorre a reprodutibilidade no tempo de retenção dos picos entre uma corrida e outra e também quando esses picos permanecem invariantes com relação as distorções. Contudo, nem sempre é possível obter esses resultados devido a alguns fenômenos não estáticos do processo de separação cromatográfica (Collins, 2006; Lanças 2009).

Algumas características como a existência de vários trajetos percorridos pelas moléculas da amostra na coluna, difusão molecular, ou seja, a dispersão das moléculas da amostra com a fase móvel, resistência à transferência de massa, ocasionada pelos diferentes tempos de retenção, podem ser razões as quais são observados perfis cromatográficos diferentes durante a eluição de uma grande quantidade de amostras (Collins, 2006).

Como discutido anteriormente, muitos aspectos podem contribuir para um resultado não satisfatório na calibração univariada. Até mesmo problemas fundamentais atrelados à técnica podem influenciar nessas respostas. Os métodos *multi-way* foram propostos para superar os desafios da análise de misturas complexas (Arancibia et al., 2012; de la Peña et al., 2015; Olivieri e Escandar, 2000; Pérez e Escandar, 2014).

Esses efeitos de variação no tempo de retenção, alargamento de pico, levam à quebra da trilinearidade, discutida na **Seção 2.3.1**. Uma forma de superar esta desvantagem é a utilização de procedimentos matemáticos capaz de regenerar a multilinearidade antes do processamento dos dados, por meio do alinhamento de pico dos compostos alvos.

Existem muitos algoritmos diferentes utilizados no alinhamento de matrizes de dados cromatográficos. Alguns mudam a matriz completa sem modificar a forma do pico, outras conseguem alterar as posições dos picos e formas. Foram relatados os seguintes: deslocamento correlacionado por intervalos – *icoshift* (do inglês: *Interval Correlation Optimized Shifting*), o deslocamento correlacionado - *coshift* (do inglês: *Correlation Optimized Shifting*) e o

alinhamento por correlação otimizada - COW (do inglês: *Correlation Optimized Warping*) (Bloemberg et al., 2013; Montemurro, Siano, Alcaráz, e Goicoechea, 2017; Nielsen et al., 1998; Parastar e Akvan, 2014; Pisano, Silva, e Olivieri, 2014; Tomasi et al., 2011, 2004).

O COW inicialmente foi utilizado como uma etapa de pré-tratamento para aplicação de métodos de primeira ordem, como os Mínimos Quadrados Parciais – PLS, ou análise de componentes principais – PCA. O algoritmo também é baseado em uma função de correção linear que consiste na sincronização de sinais inteiros, na busca a partir da inclinação de um segmento alvo, que leva a um número de intervalos (comprimentos), comparando-os a uma função correspondente da amostra. Quando a inclinação de um segmento da função de correção não é homogênea, a interpolação linear é usada para que o intervalo na amostra seja compactado ou expandido para o mesmo número de intervalos correspondente ao alvo. Esse método também é conhecido como deformação do eixo temporal (Nielsen et al., 1998; Tomasi et al., 2011, 2004).

O coshift também consiste no alinhamento de um sinal através de uma amostra alvo, que pode ser um sinal real, sintético ou a média dos sinais, que busca a máxima correlação cruzada do deslocamento do sinal, ou seja, a diferença entre as funções geradas pelos sinais são minimizadas e as similaridades maximizadas. O icoshift é uma derivação do alinhamento de correlação. No entanto, como o próprio nome já diz, é preciso que o usuário defina os intervalos de acordo com os dados modelados (Savorani, Tomasi, e Engelsen, 2010; Tomasi et al., 2011, 2004). Nesse método podem ser implementados estratégias de segmentos simples, definidos de igual comprimento, ou definições de intervalo fornecidos pelo usuário.

O coshift e o icoshift têm aspectos significativos com relação a velocidade do cálculo comparados ao COW, que é amplamente utilizado para o alinhamento de sinais cromatográficos porque consegue resolver alguns problemas de alargamento de pico (Montemurro et al., 2016; Savorani et al., 2010; Tomasi et al., 2011). De acordo com os dados gerados, faz-se necessário um teste destes algoritmos, avaliando os aspectos de alinhamento, bem como o perfil espectral dos compostos envolvidos a fim de avaliar qualquer distorção ou mudança nos perfis.

2.8 Planejamento experimental

Um dos quatro grandes pilares da quimiometria é a otimização e estudo de condições experimentais via planejamento. O que objetiva realizar experimentos com repostas satisfatórias, observando a contribuição ou influência das variáveis nas respostas de interesse e

atingi-lo com o menor número de etapas (Barros Neto; Scarminio; Bruns, 2010; Komsta et al., 2018).

Planejar significa definir antecipadamente um conjunto de ações ou intenções. Por isso, além de avaliar a influência dos fatores como resposta, um dos principais objetivos do planejamento experimental é a otimização do número de ensaios a ser realizado a fim de estabelecer um número adequado de experimentos que minimizem os erros através da aleatoriedade e variabilidade das condições do estudo (Barros Neto; Scarminio; Bruns, 2010).

Em cromatografia, a influência dos diversos fatores, como temperatura, fluxo e parâmetros de fase móvel, projetados para estimar uma melhor resposta, seja em função da otimização da separação, tempo ou gasto de solventes e reagentes, devem levados em conta. O planejamento é uma das ferramentas para atingir o objetivo (Komsta et al., 2018).

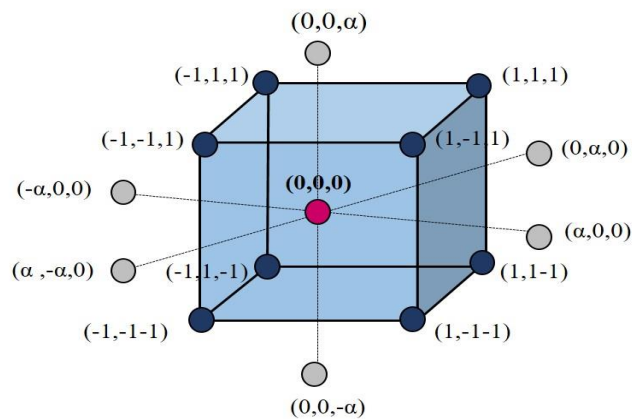
Contudo, não são apenas esses princípios que regem a otimização do planejamento experimental. Outros fatores não controláveis devem ser minimizados, e a aleatoriedade sempre deve ser levada em consideração, para que as variáveis estudadas e os erros experimentais sejam minimizados. Em um planejamento de misturas é possível alcançar esse objetivo. Por isso, são comuns no preparo de misturas de teste os planejamentos Fatoriais, Taguchi, Plackett- Burman (Barros Neto; Scarminio; Bruns, 2010; Komsta et al., 2018).

O planejamento de composto central- CCD (do inglês: *Central Composite Design*) foi apresentado como uma evolução do planejamento com K fatores, sendo o planejamento mais popular apropriado para reduzir a quantidade de experimentos. Uma vantagem do CCD é que eles podem ser construídos sequencialmente de acordo com a necessidade, já que é formado por três partes distintas, como será apresentado a seguir. Um planejamento de 3^3 , por exemplo, necessita de uma quantidade muito grande de experimentos. Esse planejamento é formado por três partes:

1. Um planejamento fatorial (ou cúbica, para esse caso), contendo um total de n_{fat} pontos de coordenadas;
2. Experimentos no ponto central, onde $x_k = 0$;
3. Experimentos nos pontos axiais com todas as coordenadas nulas, exceto uma, que é igual a um certo valor α ou $-\alpha$;

Na **Figura 10** é representado um planejamento composto central para três fatores.

Figura 10 - Planejamento composto central – CCD para três fatores. (●) planejamento fatorial, (●) experimentos axiais e (●) ponto central.



Fonte: Adaptado de :Teófilo e Ferreira, 2006; Barros Neto et.al., 2010.

Para cada uma das três formas é preciso definir o tipo de planejamento fatorial, qual o valor de α e quantas repetições serão feitas no ponto central.

Esse planejamento apresenta como vantagem a rotabilidade ou blocagem ortogonal, além de pouco número de ensaios, sendo indicado quando se trabalha com uma grande quantidade de fatores e níveis (Teófilo e Ferreira, 2006; Barros Neto et.al., 2010).

A background image showing a row of laboratory glassware, including test tubes and beakers, some containing colored liquids (orange, yellow, pink, grey) and others with plant-like structures growing out of them. The image is faded and serves as a backdrop for the title.

CAPÍTULO 3

METODOLOGIA

3 METODOLOGIA

3.1 Reagentes

Foram utilizados padrões de alta pureza de Carbendazim - **CBZ** (Metil benzimidazol-2-ilcarbamato), Tiabendazol - **TBZ** (2- (Tiazol-4-il benzimidazol)), Fuberidazol - **FBZ** (2- (2-furanil) -1H benzidazol), Carbofuran - **CBF** (2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-ilmetilcarbamato), Carbaril - **CBR** (1-naftil metilcarbamato), Flutriafol - **FLT** ((RS) -2,4'-difluoro-a- (1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil (benzidril álcool)), e 1-Naftol - **NFT** (Naftalen-1-ol), todos com pureza acima de 97% e adquiridos da Sigma-Aldrich. Acetonitrila e metanol (grau HPLC da J. T. Baker, México) e água deionizada Mili-Q (Millipore) foram utilizadas em todos os experimentos. Um Kit comercial AOAC 2007.01 foi empregado no processo de extração, com de sulfato de magnésio e de acetato de sódio.

3.2 Conjuntos de calibração e teste

Os conjuntos de calibração e teste foram preparados a partir de soluções padrões estoque nas seguintes concentrações: 320, 232, 250, 128, 126, 300 e 536 mg L⁻¹ para CBZ, TBZ, FBZ, CBF, CBR, FLT e NFT respectivamente, todos preparados a partir da massa do analito em 100 mL de metanol. Uma segunda solução estoque de 50 mg L⁻¹ para cada analito foi preparada em acetonitrila para auxiliar no preparo dos conjuntos de calibração e teste. O conjunto de calibração foi realizado com 8 soluções (misturas dos 7 analitos), com concentração variando de 0,05 a 18,00 mg L⁻¹ para CBZ, TBZ e FBZ; de 0,05 a 11,0 mg L⁻¹ para CBF; de 0,05 a 7,0 mg mL⁻¹ para CBR; de 0,05 para 13,0 mg L⁻¹ para NFT e de 0,05 a 28,0 mg L⁻¹ para FLT, preparados de acordo com a sensibilidade e linearidade de cada analito.

O conjunto de teste, utilizado para validação da metodologia por meio das técnicas quimiométricas, foi constituído por 17 soluções preparadas através de um planejamento composto central (CCD), de acordo com a **Tabela 2**. O planejamento realizado foi o fatorial completo 2³, para os três primeiros analitos e o fracionado 2⁴⁻¹ para os outros quatro analitos, todos com pontos axiais e três pontos centrais, concatenados um ao lado do outro.

Tabela 2- Matriz do planejamento do conjunto teste.

EXP	CBZ	TBZ	FBZ	CBF	CBR	FLT	NFT
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	1	-1	1	-1
3	-1	1	-1	-1	1	1	-1
4	1	1	-1	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	-1	-1	1	1
6	1	-1	1	1	-1	-1	1
7	-1	1	1	-1	1	-1	1
8	1	1	1	1	1	1	1
9	-2	0	0	-2	0	0	0
10	2	0	0	2	0	0	0
11	0	-2	0	0	-2	0	0
12	0	2	0	0	2	0	0
13	0	0	-2	0	0	0	-2
14	0	0	2	0	0	0	2
15	0	0	0	0	0	-2	0
16	0	0	0	0	0	2	0
17	0	0	0	0	0	0	0

Na **Tabela 3** é apresentado os níveis do planejamento e as cinco concentrações de cada analito (mg L^{-1}) utilizadas no conjunto teste.

Tabela 3- Níveis de concentração utilizados no planejamento CCD para o conjunto teste em mg L⁻¹.

Nível do planejamento (CCD)	CBZ	TBZ	FBZ	CBF	CBR	FLT	NFT
-2	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
-1	2,0	2,0	2,0	2,0	1,0	5,0	3,0
0	6,0	6,0	6,0	4,0	2,0	10,0	6,0
1	10,0	10,0	10,0	6,0	3,0	15,0	9,0
2	17,0	17,0	17,0	10,0	6,0	26,0	12,0

3.3 Preparo das amostras para quantificação de resíduos de pesticidas

Seis amostras de hortaliças foram escolhidas segundo dados do Programa de Análise de Resíduos de Pesticidas (PARA), nos anos de 2013 a 2015. Dois frutos (tomate e pimentão), duas folhas (alface e couve) e dois tubérculos (cenoura e beterraba) foram adquiridos no mercado público de João Pessoa – PB e acondicionadas em sacos herméticos a -20 ° C.

Inicialmente as amostras foram trituradas, sem nenhum pré – tratamento, em um processador de alimentos até homogeneização, e uma porção de aproximadamente 2 g foi transferida para um tubo falcon de 15 mL junto a 2 mL de acetonitrila, em seguida foi feita a homogeneização em um vórtex por 1 min.

O procedimento de extração adotado foi o oficial AOAC 2007.01 Método QuEChERS com algumas modificações. Um kit comercial para o método de extração oficial AOAC 2007.01 foi empregado. Foram adicionados a mistura 1 g de sulfato de magnésio e 0,5 g de acetato de sódio, e homogeneizados em um agitador vórtex por 1 min e depois centrifugados por 5 min a 4000g. Foram coletados 1 mL da fase orgânica e os extratos foram secos com um fluxo suave de nitrogênio. Finalmente, o extrato seco foi reconstituído a 0,2 mL em uma solução de acetonitrila / água (10:90 v / v) e passado por um filtro nylon de 0,45 µm antes da análise. Essa etapa consiste na pré-concentração dos analitos a fim de chegar a níveis mais baixos de concentração. Cada amostra foi executada em triplicata e sua média usada para tratamento de dados.

Figura 11- Etapas do método de extração QuEChERS.

Fonte: Autora.

3.4 Efeito de matriz

Para avaliar a recuperação da metodologia e a presença de algum efeito matricial, foram realizados adição de padrão de cada pesticida em quatro níveis de concentração diretamente nas amostras. O efeito de matriz possibilita avaliar a seletividade causada pela presença de possíveis interferências provenientes de uma amostra, assim é possível avaliar o paralelismo entre as curvas com os sinais dos padrões e as amostras fortificadas.

Para facilitar a adição e reduzir o erro de identificação quatro misturas com os sete pesticidas foram preparadas diluindo uma alíquota apropriada da solução padrão de estoque com acetonitrila para uma concentração dez vezes maior que o nível de concentração de adição desejado. Cada amostra com adição de padrão foi extraída usando o mesmo procedimento da **Seção 3.3**. Os níveis de concentração utilizados na adição de padrão são os apresentados na **Tabela 4**.

Tabela 4 - Níveis de concentração utilizados nos testes de efeito de matriz e recuperação em mg L^{-1} .

CBZ	TBZ	FBZ	CBF	CBR	FLT	NFT
0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
2,0	2,0	2,0	2,0	1,0	5,0	3,0
6,0	6,0	6,0	4,0	2,0	10,0	6,0
10,0	10,0	10,0	6,0	3,0	15,0	9,0

3.5 Análise cromatográfica

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo Dionex da série Ultimate 3000 (Dionex Technologies), composto por bomba quaternária, injetor manual equipado com uma válvula de seis vias com alça de amostragem fixa de 20 μL . Foi utilizado ainda, uma coluna Acclaim® 120 de C18 (2,1 x 10 cm, 5 μm de partícula e 120 Å de tamanho de poro) da Dionex Technologies e detector UV- visível de arranjo de diodos – DAD.

A eluição foi realizada em modo gradiente, que consiste na variação regular da força do eluente, com água deionizada (solvente A) e acetonitrila (solvente B) como o descrito a seguir: 0-1 min: 10% B, de 1-6 min: gradiente linear de 10% a 35% de B, mantendo-se até 10 min nessa proporção final, por fim, a proporção inicial é retomada permanecendo por 4 min para estabilização. A vazão de fluxo foi de 0,5 mL min^{-1} e a temperatura do compartimento da coluna foi de 35° C. Os dados foram coletados usando o software Chromeleon, Versão 6.80 com uma frequência de aquisição de espectro de 5 Hz.

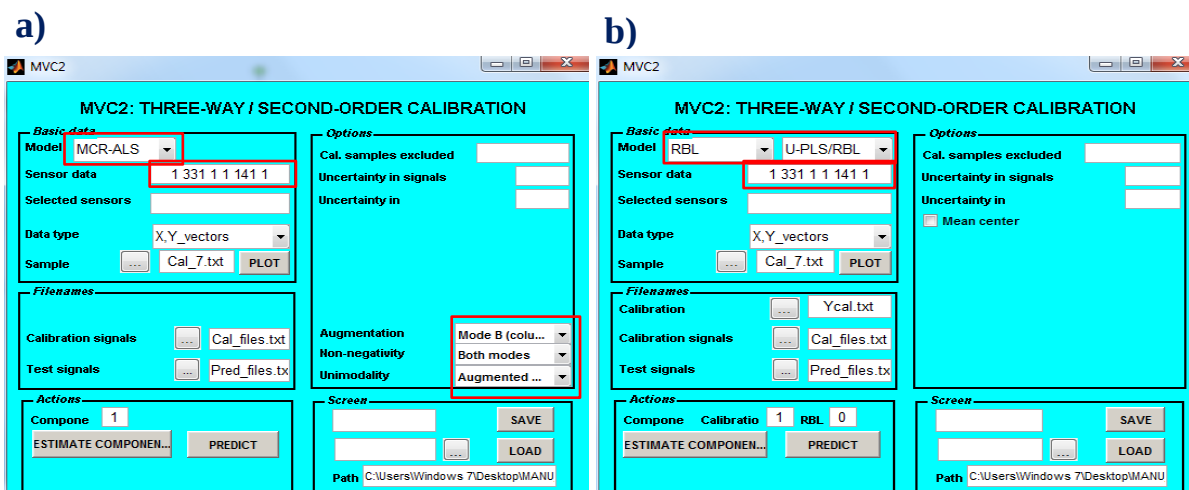
3.6 Software e análise de dados

Os dados foram processados em ambiente MATLAB® 2010, com alinhamentos coshift, icoshift e COW, na fase de teste de melhores resultados (Nielsen et al., 1998; Tomasi et al., 2011). Todos os testes foram realizados tendo como alvo a amostra 7 do conjunto de calibração (15 mg L^{-1} para CBZ, TBZ e FBZ; 9 mg L^{-1} CBF; 5,5 mg L^{-1} CBR; 11 mg L^{-1} NFT e 24 mg L^{-1} FLT). O icoshift foi processado em três intervalos com 21, 42 e 63 variáveis, respectivamente, em cada intervalo, tendo um total de 751 variáveis nessa região de estudo.

Os cálculos envolvendo o MCR-ALS e o UPLS-RBL foram feitos usando o MVC2, uma interface do MATLAB, disponível em www.iquir-conicet.gov.ar/descargas/mvc2.rar, implementada por Olivieri e colaboradores (Olivieri, Wu, e Yu, 2009).

Na **Figura 12** é mostrado a interface de inicialização do MVC2, onde é possível a escolha do algoritmo desejado (model), tamanho dos dados (sensor data), bem como a seleção de dados, com cortes, para modelar um tamanho menor, e no caso do MCR-ALS as opções de restrições, para reduzir a ambiguidade rotacional e orientar na otimização do ALS. A correspondência entre as espécies, não negatividade em ambos os modos (espectrais e cromatográficos), e unimodalidade, aplicado apenas aos perfis de concentração (cromatográficos) foram informados para obter perfis quimicamente interpretáveis.

Figura 12 - a) Interface gráfica do MVC2 para o MCR-ALS **b)** UPLS-RBL. Marcado em vermelho, a escolha do modelo, tamanho dos dados, e para o MCR-ALS, as restrições.



Fonte: Captura da imagem da interface do MVC2, por Olivieri e colaboradores (Olivieri, Wu, e Yu, 2009)

3.6.1 UPLS- RBL

O conjunto de calibração e validação foram divididos em quatro regiões, onde a primeira continha apenas o CBZ, a segunda TBZ e FBZ, a terceira CBF e a quarta região com CBR, FLT e NFT, com isso o número de variáveis latentes (VL) diversificam de acordo como número de constituintes em cada região. A etapa de RBL é aplicada nas amostras que apresentarem resíduo maior do que as amostras de calibração e teste, oriunda dos efeitos dos possíveis interferentes. Como o nome indica, a etapa de RBL busca modelar os resíduos (a parte da amostra de teste inexplicada pelo PLS) assumindo que eles podem ser organizados em uma matriz bilinear (de la Peña et al., 2015; Olivieri e Escandar, 2000).

3.6.2 MCR – ALS

O MCR-ALS estima o número de N componentes na matriz X de dados remontando uma matriz C de concentrações ou uma matriz S^T , correspondente aos espectros. A partir disso é possível definir as restrições a serem aplicadas no processo de iteração até que a solução ideal seja encontrada. Após estimar e definir o número ótimo de PCs foram aplicadas restrições necessárias para otimização do ALS a fim de reduzir a ambiguidade rotacional e obter perfis espectrais quimicamente interpretáveis. Dessa forma, quatro restrições foram aplicadas: a) não negatividade nos perfis espectrais e cromatográficos; b) unimodalidade, aplicado apenas aos perfis de concentração (cromatográfico); c) correspondência entre as espécies, utilizada para informar ao algoritmo quais os constituintes estão ou não presentes no conjunto de calibração; e d) normalização dos espectros realizada pela norma de frobenius.



CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 . RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Subtração do branco e escolha da faixa de trabalho

As formas de eluição, isocrática ou gradiente, são um dos fatores cruciais na separação dos analitos. Tradicionalmente, quando se trata de dados cromatográficos com ordem superior a fim de se obter a vantagem de segunda ordem é empregada a eluição isocrática. Esse modo de eluição permite a coeluição dos picos e a redução do tempo da corrida cromatográfica, e evita a presença de perfis de linha de base que possam ser recuperados pelo modelo matemático (Boeris et al., 2014; Maggio et al., 2011; Monzón et al., 2018; Moreira et al., 2015; Mortera et al., 2018; Pellegrino Vidal et al., 2017; Pérez e Escandar, 2014; Vosough e Mojdehi, 2011; Vosough e Tehrani, 2018). Contudo, quando é necessário quantificar vários analitos que possuem retenções bem distintas na coluna cromatográfica, a forma de eluição gradiente é uma alternativa interessante.

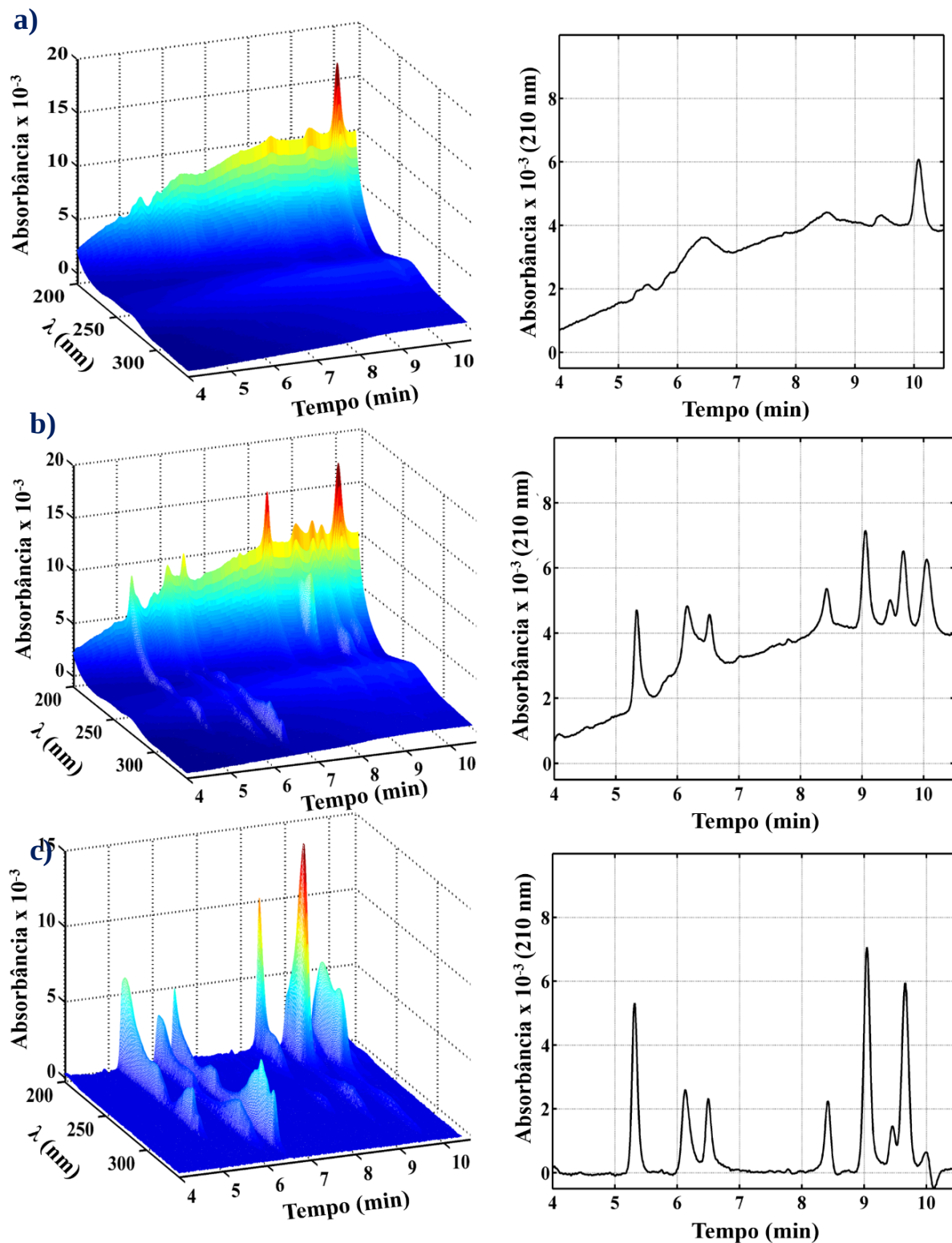
Neste trabalho, foi utilizado uma eluição gradiente que também traz vantagens como (1) aumento do tempo entre o sinal do solvente e o primeiro sinal do analito (volume morto), reduzindo a interferência de constituintes com menos retenção na coluna; (2) limite de quantificação mais baixo, especialmente para os analitos com maior retenção na coluna; (3) largura dos picos mais estreitos; (4) melhoria da resolução e transferência de massas dos analitos e (5) eluições mais rápidas.

Embora haja benefícios com esse tipo de eluição, essas mudanças de solventes geram um perfil de linha de base que é de difícil reprodução, em especial ao usar uma bomba quaternária durante as análises devido a troca e misturas dos solventes no equipamento, comprometendo os resultados dos modelos quimiométricos que podem interpretar esse perfil de linha de base como constituinte diferente.

Para contornar essa adversidade é proposto utilizar a informação do sinal de um branco, preparado a partir de uma mistura de acetonitrila e água (35%/65%), mesma proporção utilizada na preparação das misturas das amostras dos conjuntos de calibração e validação. Diariamente foi realizada esse procedimento e o sinal subtraído das amostras.

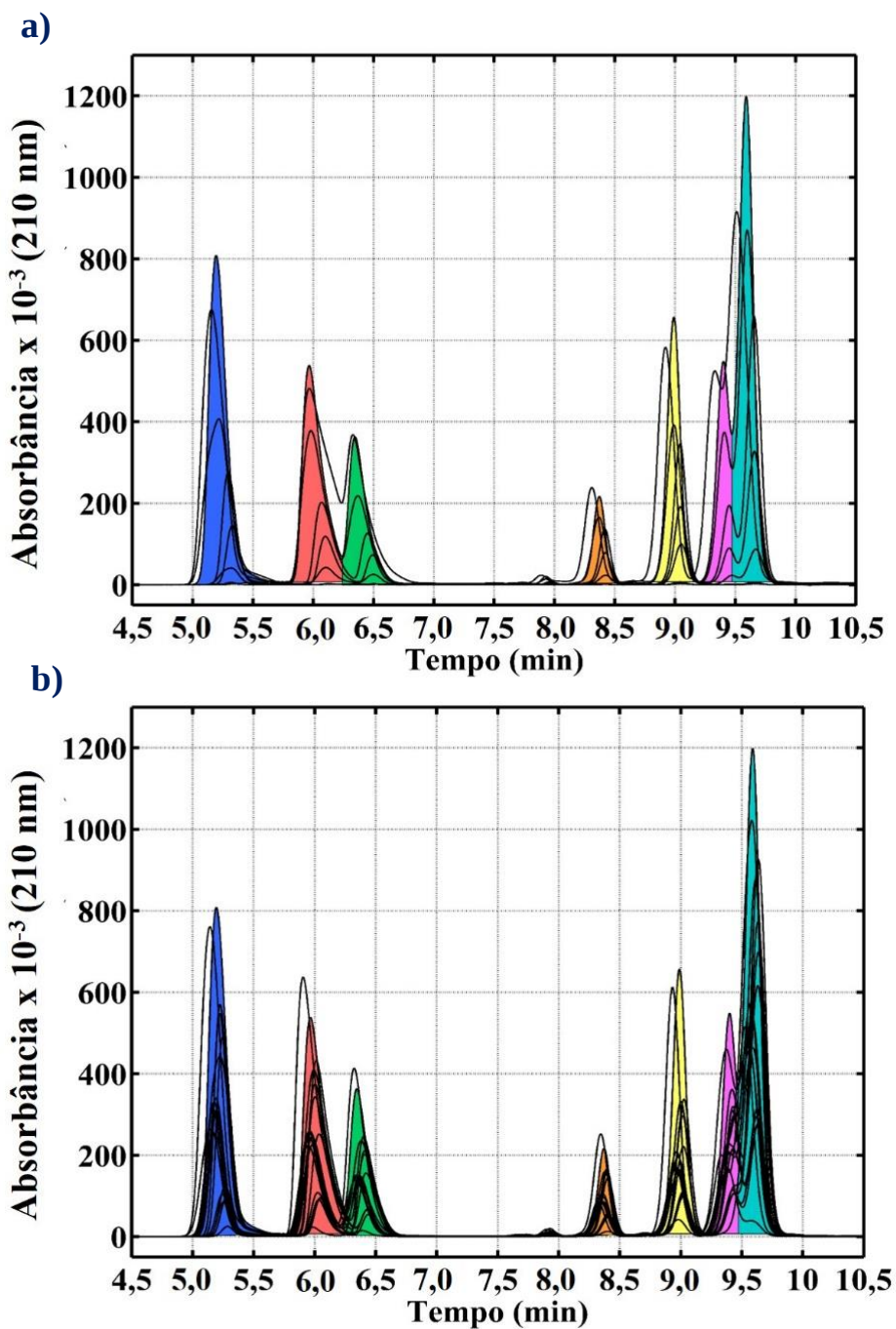
Na **Figura 13** são apresentados os perfis do branco: **(a)** eluição cromatográfica da amostra 2 ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$) do conjunto de calibração, com a presença do branco **(b)**, em **(c)** é mostrado o cromatograma em 3D da mesma amostra 2 do conjunto de calibração com a subtração do branco. É válido salientar que a injeção do branco não é feita entre cada amostra, e sim realizada no início e ao final do procedimento analítico para acompanhar essa variação.

Figura 13 - Perfis de eluição cromatográfica. **a)** branco, **b)** perfil do nível 2 ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$) do conjunto de calibração e **c)** perfil do nível 2 subtraído do branco. Lado esquerdo, perfis em 3D e lado direito, os perfis em 2D, registrados em 210 nm. A escolha desse comprimento de onda é devido a sensibilidade que todos os analitos apresentam.



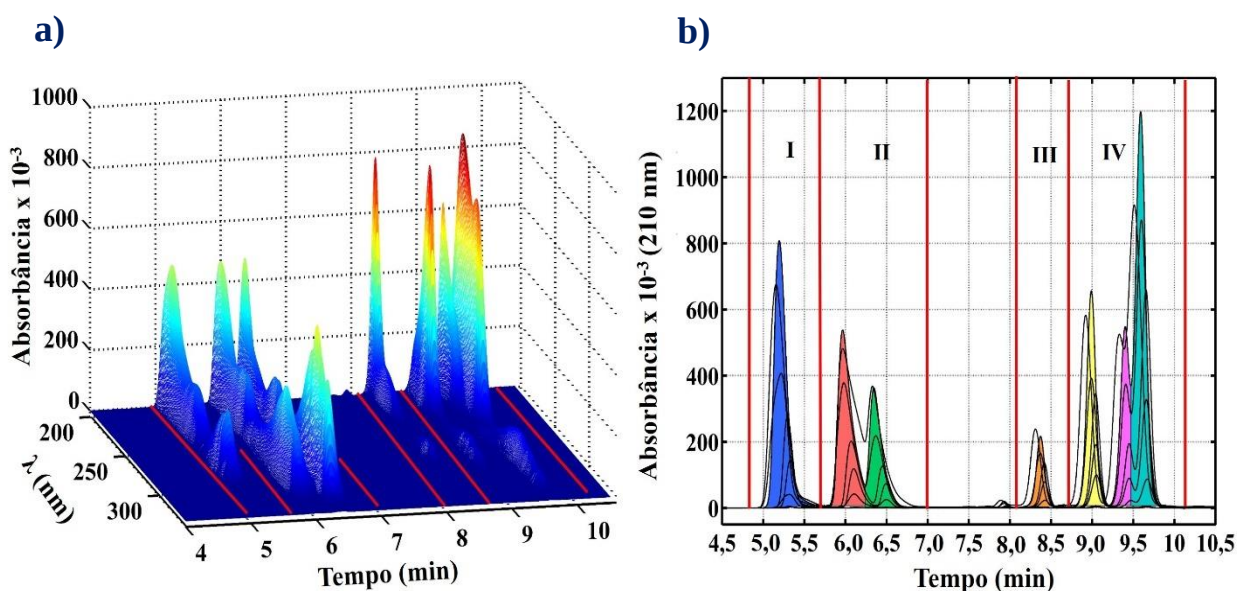
Após essa etapa de subtração é possível visualizar mais facilmente as variações do sinal dos analitos. Na **Figura 14 a e b** são apresentados os cromatogramas em 2D, registrados em 210 nm dos conjuntos de calibração e validação, respectivamente.

Figura 14 - Cromatogramas em 2D dos perfis de eluição dos conjuntos de calibração **(a)** e **(b)** validação (teste). O destaque em cor é a amostra 7 do conjunto de calibração (15 mg L⁻¹ para CBZ, TBZ e FBZ; 9 mg L⁻¹ CBF; 5,5 mg L⁻¹ CBR; 11 mg L⁻¹ NFT e 24 mg L⁻¹ FLT). CBZ (—), TBZ (—), FBZ (—), CBF (—), CBR (—), FLT (—), NFT (—).



Por inspeção visual da **Figura 14** foram escolhidos e realizados os cortes do tempo de eluição cromatográfica de interesse, já que a corrida total é de 14 minutos. Esse procedimento foi realizado porque uma grande quantidade de constituintes, especialmente com perfis espectrais semelhantes, dificulta a capacidade dos algoritmos convergirem e recuperarem os perfis corretos. Outro fator é com relação ao esforço computacional, visto que os dados são tridimensionais e levam em consideração o tempo de eluição, a absorbância dos sinais e o comprimento de onda do UV (190-400 nm). Assim, com essa abordagem, pode-se reduzir o tempo de cálculo consideravelmente. Foram selecionados tempos de retenção entre os analitos, excluindo faixas que não apresentavam sinais, mas também comprimentos de ondas que não tinham respostas, acima de 340 nm. Para conduzir o algoritmo à convergência, os cromatogramas foram divididos em quatro regiões, mostrados na **Figura 15 a e b**. A primeira região (de 4,6 a 5,7 min), para quantificar CBZ, a segunda região (de 5,7 a 7,0 min) para TBZ e FBZ, a terceira, CBF (de 8,0 a 8,7 min) e a quarta região (8,7 a 10,4 min) para quantificar CBR, FLT e NFT.

Figura 15 - a) Divisão das regiões no cromatograma 3D para convergência dos algoritmos. Região I (4,6-5,7 min), Região II (5,7-7,0 min), Região III (8,0-8,7 min), Região IV (8,7-10,4 min). **b)** Cromatogramas do conjunto de calibração em 2D registrados em 210 nm. CBZ (—), TBZ (—), FBZ (—), CBF (—), CBR (—), FLT (—), NFT (—).



4.2 Alinhamento dos dados

Os fatores específicos dos dados presentes é a existência de mudanças no perfil de tempo de eluição e o alargamento de pico, que foram discutidos anteriormente nas propriedades da técnica cromatográfica. Neste conjunto de dados é marcante a variação do tempo de retenção, tanto no conjunto de calibração, quanto no conjunto de teste, apresentado na **Figura 14 a e b**.

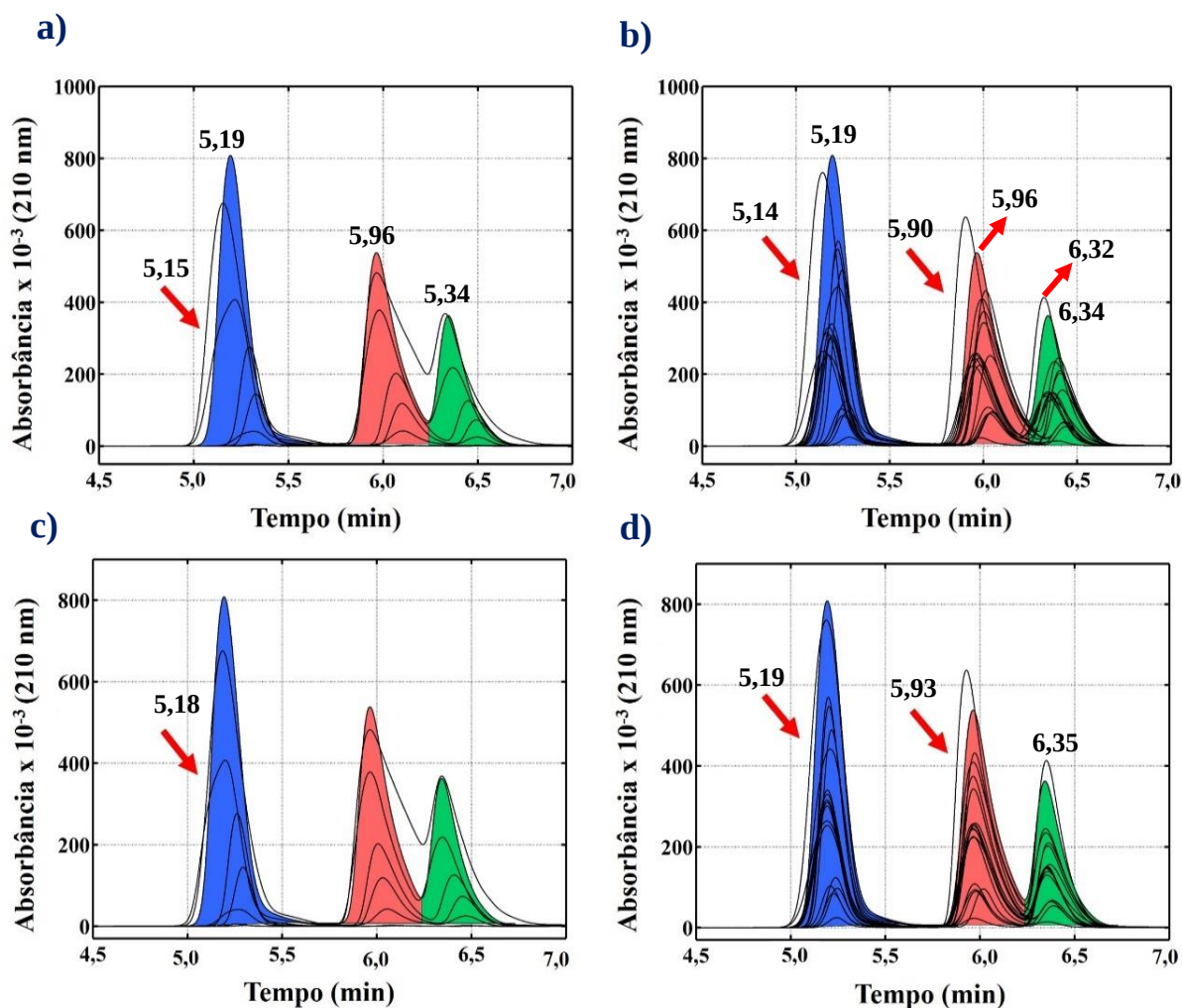
Os analitos estudados possuem variações distintas e, como estão parcialmente coeluídos, também apresentam comportamentos diferentes entre uma injeção e outra. Para auxiliar os algoritmos à convergência, foi realizada uma etapa de pré-processamento, baseada no alinhamento de picos cromatográficos, que foram avaliadas e discutidas de acordo com a inspeção visual a fim de obter um desempenho de acordo com o objetivo da análise de dados.

Muitos algoritmos com diferentes estratégias estão disponíveis para o alinhamento de matrizes de dados de cromatografia. Como discutido anteriormente, alguns deles deslocam toda a matriz em relação a uma amostra de referência, sem modificar as formas ou picos, uns conseguem só deslocar, e outros modificam os picos, alargando ou comprimindo.

Todas essas possibilidades foram testadas, realizando divisões de regiões para facilitar o cálculo computacional. Todos os testes foram realizados tendo como alvo a amostra 7 do conjunto de calibração (15 mg L⁻¹ para CBZ, TBZ e FBZ; 9 mg L⁻¹ CBF; 5,5 mg L⁻¹ CBR; 11 mg L⁻¹ NFT e 24 mg L⁻¹ FLT), que está sobreposta as linhas destacado em cores.

O alinhamento COW foi processado dividindo o cromatograma em duas regiões, apresentando alinhamento não muito satisfatório. Na **Figura 16 a e b** é apresentado o espectro em 2D do conjunto de calibração e teste da região I (CBZ, TBZ e FBZ), sem alinhamento e na **Figura 16 c e d** os mesmos cromatogramas alinhados com o algoritmo COW.

Figura 16 – Cromatogramas, registados em 2D no comprimento de 210 nm, das regiões I (CBZ) e II TBZ e FBZ) nos conjuntos: **(a)** Calibração e **(b)** validação ou teste. Cromatogramas 2D dos conjuntos de calibração **(c)** e teste **(d)**, após o alinhamento COW. CBZ (—), TBZ (—), FBZ (—). As setas indicam o tempo de retenção do pico de cada analito com e sem alinhamento.



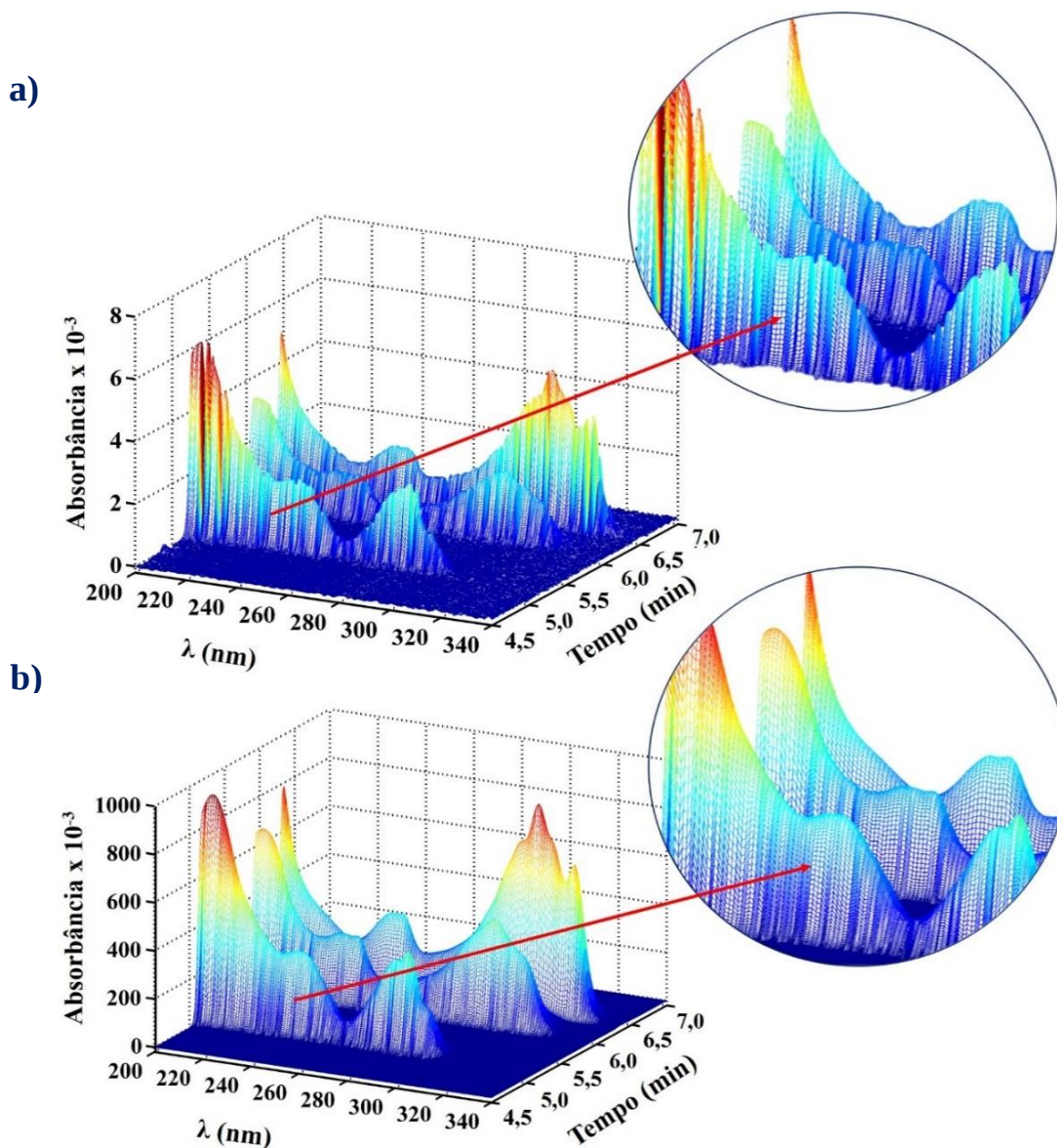
Fonte: Autora.

É possível notar que o alinhamento foi efetivo quando se compara o antes e depois do COW. Contudo, quando foi realizada a inspeção dos perfis espectrais, é possível perceber que houve distorções bruscas tanto de amostras de concentrações baixas, como a amostra 2 de calibração (0,1 mg L⁻¹), quanto nos perfis 3D de concentração elevada, amostra 7 de calibração (15 mg L⁻¹ para CBZ, TBZ e FBZ; 9 mg L⁻¹ CBF; 5,5 mg L⁻¹ CBR; 11 mg L⁻¹ NFT e 24 mg L⁻¹ FLT), mostrado na **Figura 17 a e b**. Essas distorções são causadas pela ausência de informações em alguns comprimentos de onda.

Para melhor avaliar o resultado é mostrado uma ampliação da região escolhida para o alinhamento, bem como as distorções que ocorreram no perfil espectral. Na verdade, as distorções ocasionam falta de informações em alguns comprimentos de onda, sendo possível

observar que há falhas no perfil espectral 3D. Isso invalida o procedimento, visto que alguns algoritmos quimiométricos se baseiam nos perfis espectrais dos compostos.

Figura 17 - a) Cromatogramas em 3D registrados após o alinhamento da região I com o algoritmo COW da amostra 2 do conjunto de calibração ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$) e **b)** da amostra 7 do conjunto de calibração (15 mg L^{-1} para CBZ, TBZ e FBZ; 9 mg L^{-1} CBF; $5,5 \text{ mg L}^{-1}$ CBR; 11 mg L^{-1} NFT e 24 mg L^{-1} FLT. As setas indicam a fragmentação do perfil espectral, ou seja, falta de informação em alguns comprimentos de onda.



Determinar o alinhamento ideal é questão de encontrar a melhor combinação das seções, onde nenhuma delas pode ser deformada por mais de t intervalos de amostra, mas se houver grande diferença entre as variáveis ao longo de t intervalos não será permitido um grau igual de alongamento e compressão.

Outra possibilidade testada para o alinhamento dos dados foi o *icoshift* que implementa uma segmentação simples, a qual é permitido definir um número de segmentos de igual comprimento, contabilizados separadamente sem levar em consideração os efeitos globais, ao contrário do COW. Na **Figura 18 a - c** são mostrados três intervalos com 21, 42 e 63 variáveis, respectivamente, tendo um total de 751 variáveis nessa região de estudo.

Neste método é possível definir o número de intervalos no eixo do tempo de retenção e os segmentos na amostra a serem alinhados e deslocados a fim de maximizar a correlação com o segmento alvo, neste caso, a amostra 7 do conjunto de calibração.

O procedimento iterativo iniciou com 5% da quantidade de variáveis, o que corresponde à, aproximadamente, 37 intervalos. Desta forma foram realizados testes com aumento da quantidade de variáveis e, conseqüentemente, a diminuição dos intervalos. O que levou a maiores distorções (sinalizado por uma seta em vermelho) tanto no perfil cromatográfico em 2D, quanto no perfil espectral, mostrado em 3D na **Figura 19 a - c**. Neste último, as distorções causam falta de informações em alguns comprimentos de onda e é possível observar o secionamento dos espectros dos constituintes da região.

Figura 18 - Cromatogramas do conjunto de calibração em 2D, registrados em 210 nm (a - c) para 21, 42 e 63 variáveis, respectivamente. CBZ (—), TBZ (—), FBZ (—).

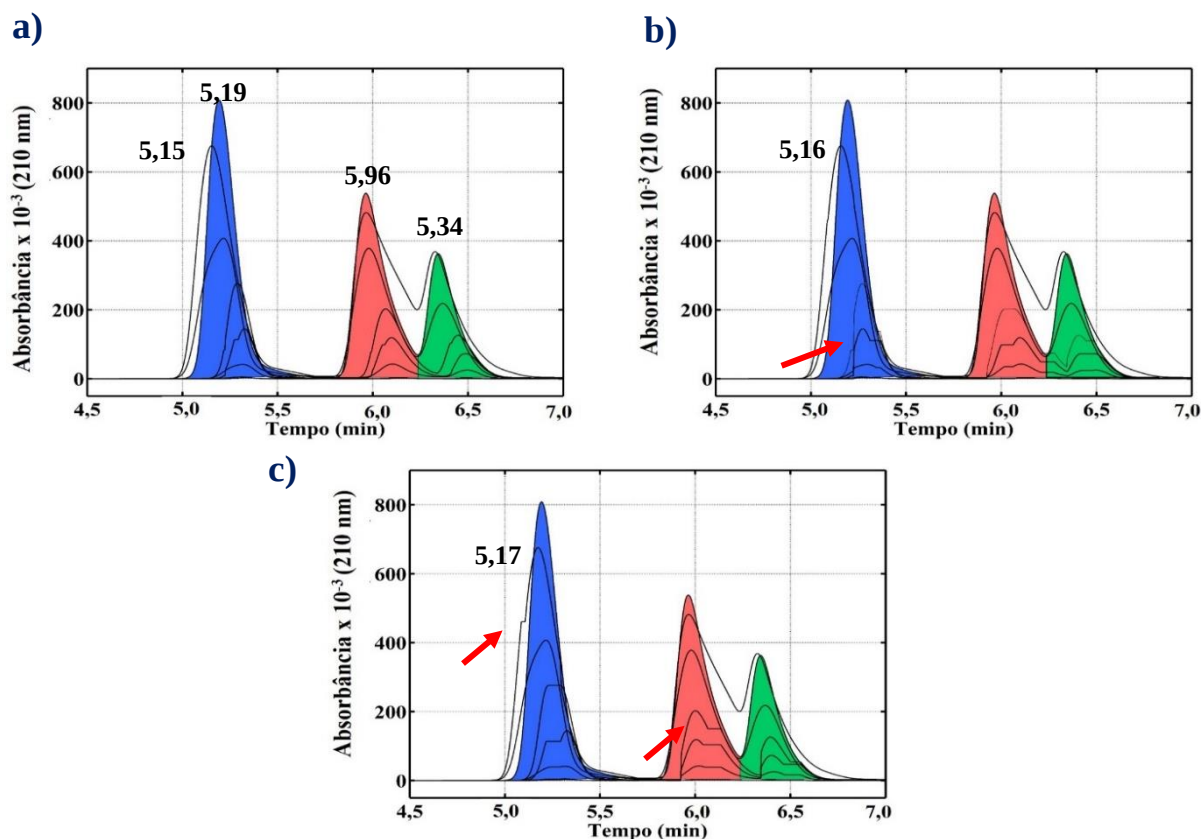
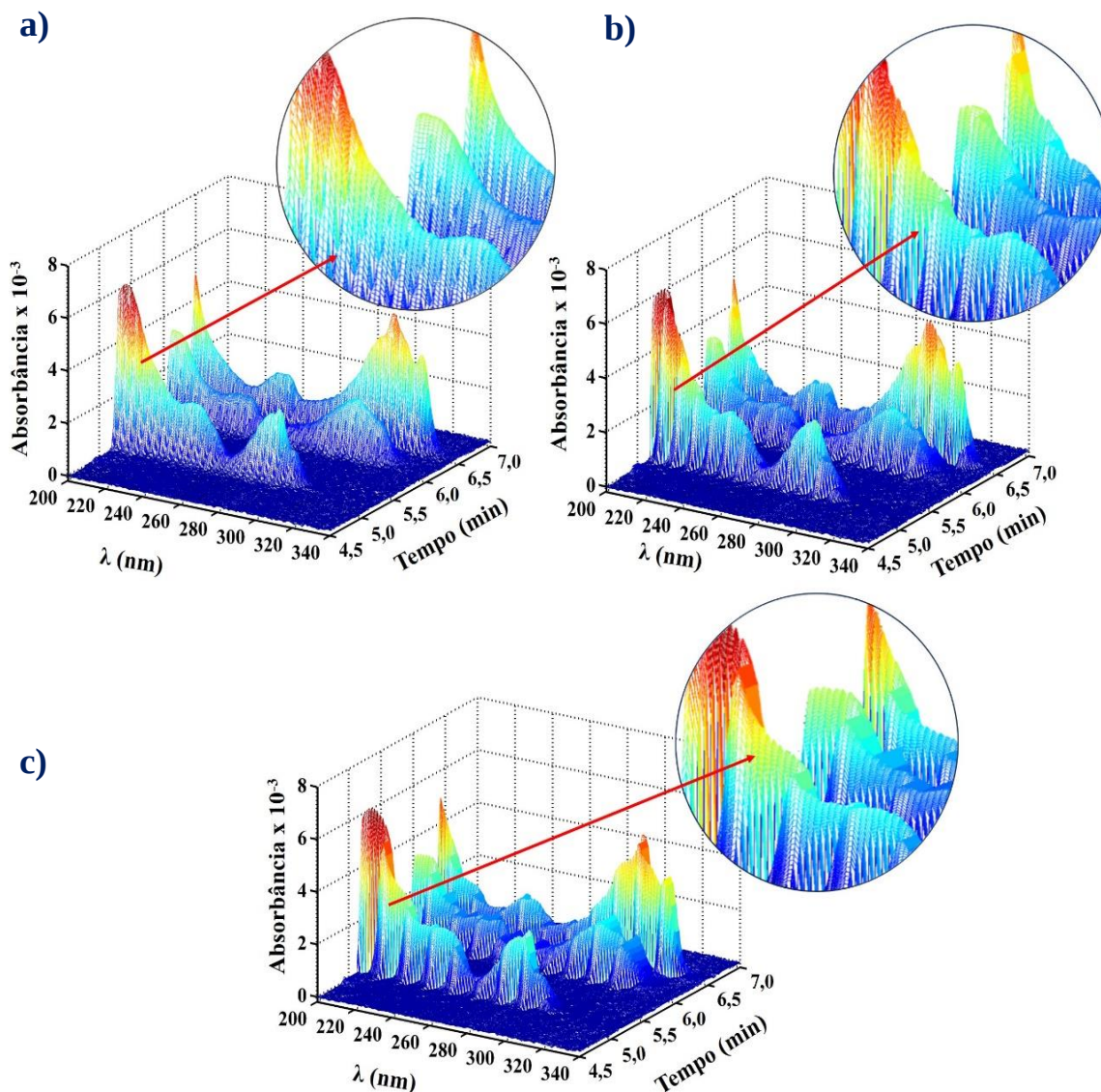


Figura 19 - Cromatogramas do conjunto de calibração em 3D, registrados em 210 nm (a - c) para 21, 42 e 63 variáveis.

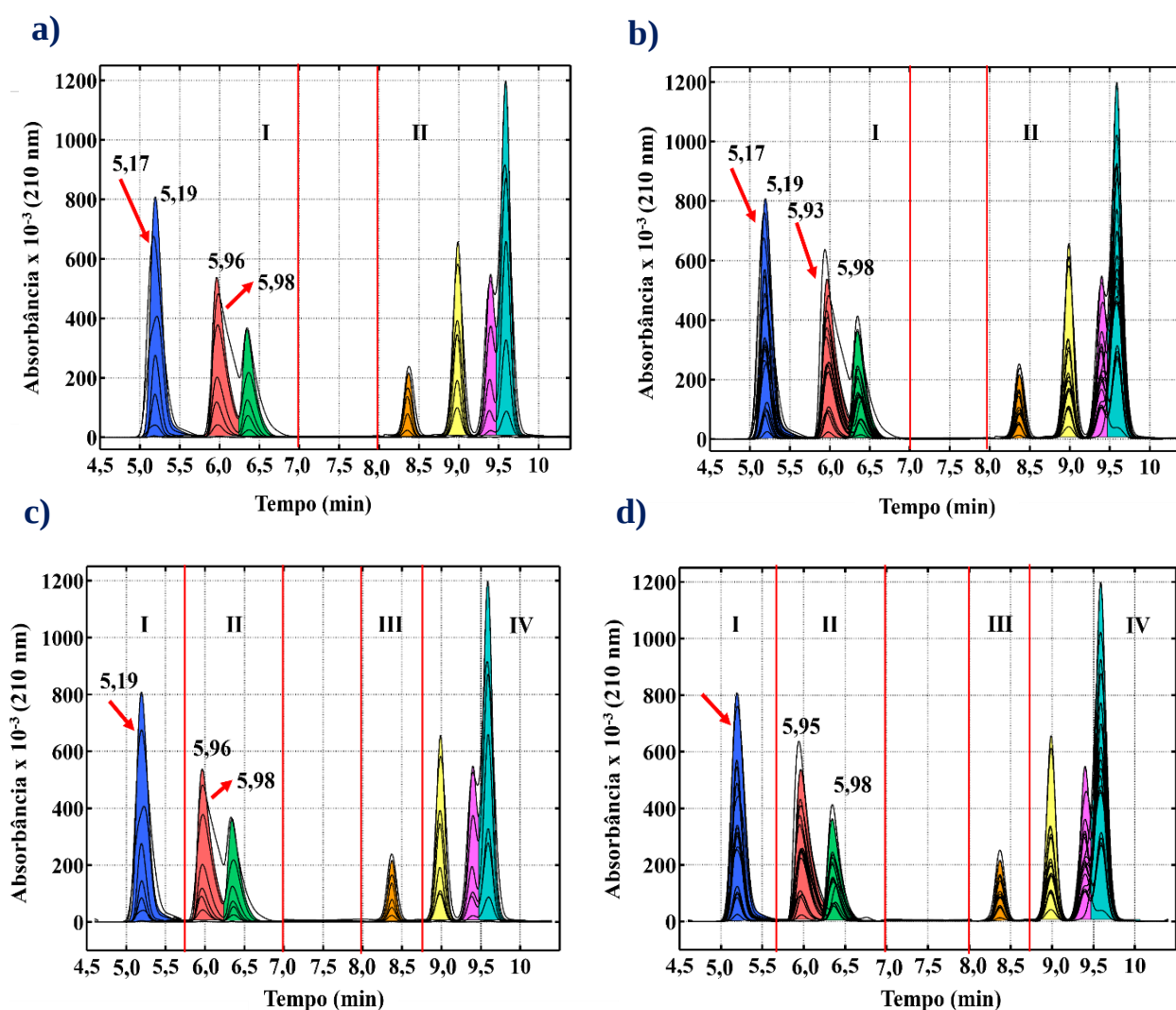


Outra possibilidade sondada nesses dados foi o uso do coshift, que também opera mudando a matriz de dados nas direções de linhas e colunas, como o *icoshift*, mas opera de modo que não é possível selecionar os intervalos dos segmentos a serem alinhados, ou seja, ele atua de modo a realizar o deslocamento total de cada vetor (cromatograma).

A eficiência do alinhamento dividindo o cromatograma em duas regiões, como feito anteriormente, obteve um resultado satisfatório sem distorções no modo tridimensional, mas ainda foi realizado teste dividindo em quatro nas regiões, como descrito na **Seção 4.1**, apresentando melhor resultado quando feita a inspeção visual.

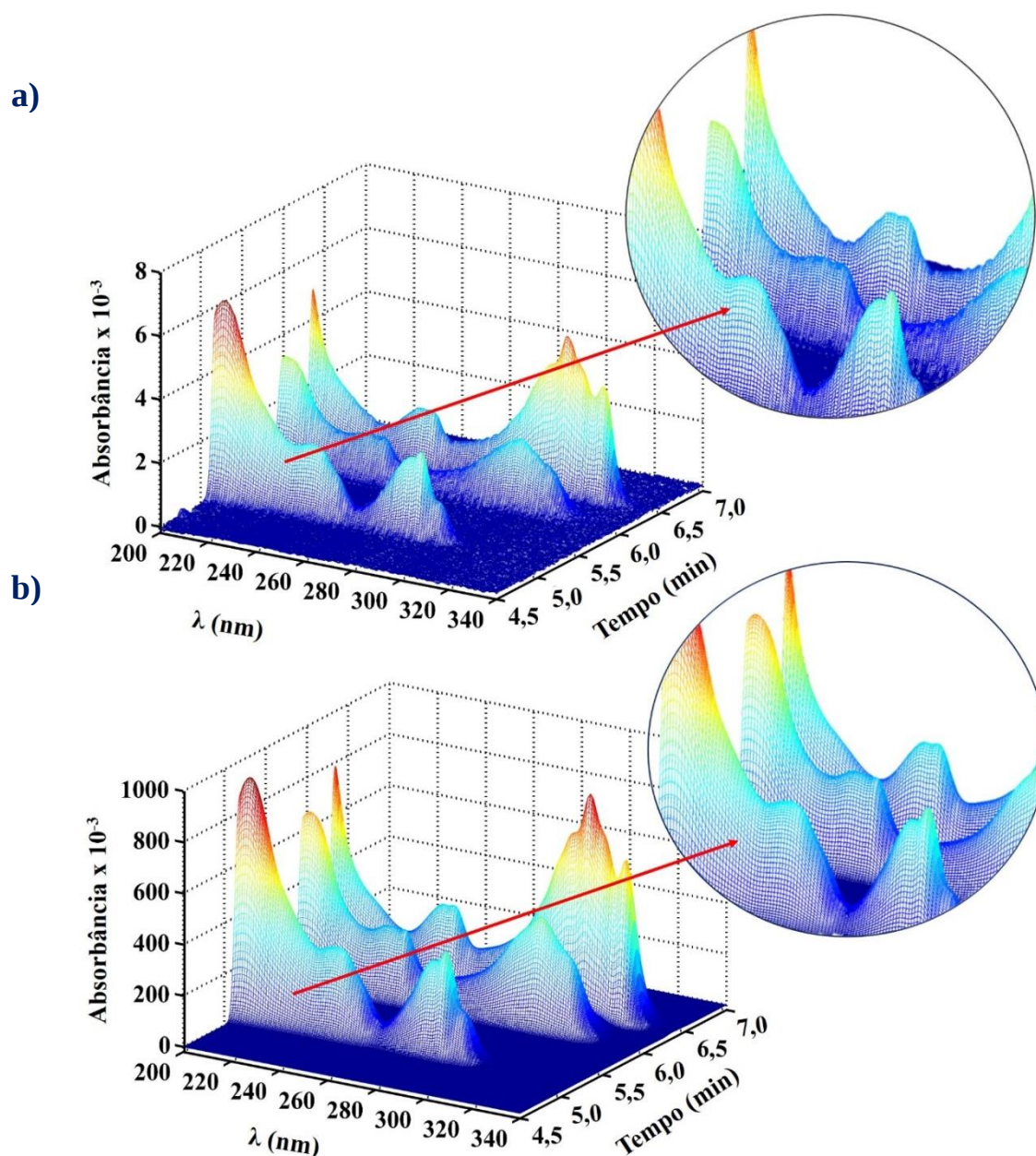
Na **Figura 20 (a - d)** é mostrado o alinhamento do conjunto de calibração divididos em duas e quatro regiões, respectivamente. Nesse caso é possível perceber que, com quatro regiões, apresenta-se uma sutil melhora nos perfis cromatográficos em 2D. Tanto para o conjunto de calibração quanto para o conjunto de validação essa diferença está marcada com uma seta vermelha.

Figura 20 - a) Cromatogramas do conjunto de calibração em 2D registrados em 210 nm, alinhados com coshift divididos em duas regiões. **b)** Cromatogramas do conjunto de validação em 2D registrados em 210 nm, alinhados com divisão em duas regiões. **c)** e **d)** Conjunto de calibração validação alinhados com divisão em quatro regiões, respectivamente. CBZ (—), TBZ (—), FBZ (—), CBF (—), CBR (—), FLT (—), NFT (—). As setas indicam o tempo de retenção do pico de cada analito com e sem alinhamento



Na **Figura 21 a e b** é apresentado o perfil 3D das amostras 2 e 7 do conjunto de calibração, que não apresentam distorções mesmo em concentração baixa, diferentemente do que foi visto nos outros dois modelos usados anteriormente.

Figura 21 - a) Cromatogramas 3D, após alinhamento coshift, da amostra 2 do conjunto de calibração ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$ para todos os analitos). **b)** Amostra 7 do conjunto de calibração (15 mg L^{-1} para CBZ, TBZ e FBZ).



Após o pré-processamento dos dados, com subtração do branco e testes de alinhamentos, o qual apresentou melhor resultado com o coshift, dividido nas quatro regiões discutidas no início da seção dos resultados, pois não houve distorções nos cromatogramas e nem nos perfis espectrais, é possível realizar o processamento dos dados multivias (três vias), utilizando a calibração de ordem superior com os cálculos de UPLS-RBL e MCR-ALS.

4.3 Calibração utilizando UPLS - RBL

Como discutido anteriormente é evidente a sobreposição de diferentes graus entre as bandas cromatográficas. Isso poderá torna-se mais relevante com a presença de interferências que podem coeluir parcialmente ou completamente com seu analito nas amostras futuras. Quando isso ocorre, somente a calibração de segunda ordem pode ser aplicada para a quantificação dos analitos de interesse para obter resultados exatos.

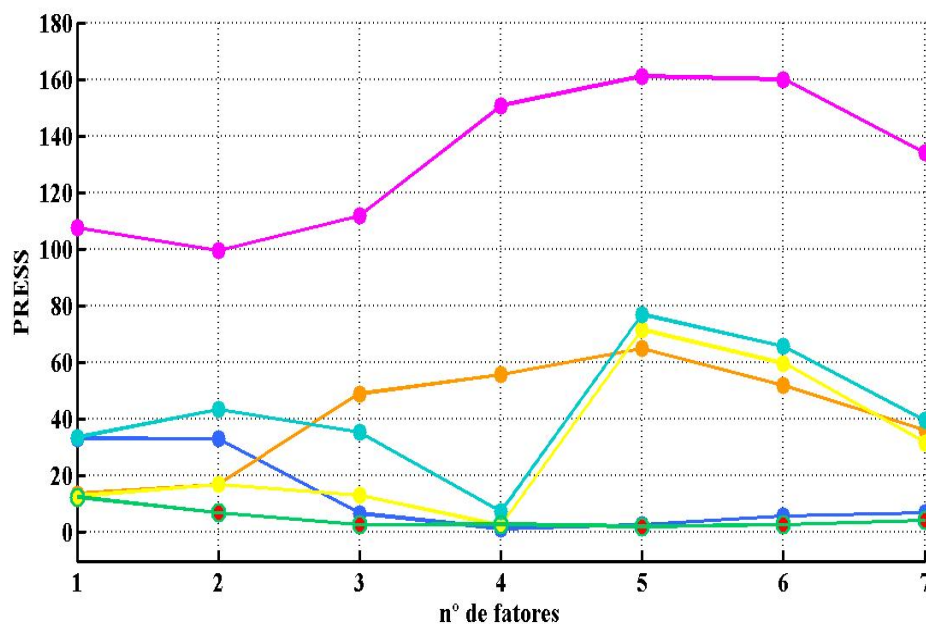
Com os dados pré-processados, como discutidos anteriormente, com a subtração do branco para remoção de linha de base a fim de evitar a recuperação de perfis não condizentes com os dos analitos e o alinhamento, foi possível avaliar os resultados obtidos pelo algoritmo.

Neste modelo, as matrizes são desdobradas em vetores $\mathbf{j} \times \mathbf{x}_1$ e então ocorre a construção do PLS, levando em consideração o vetor das concentrações de calibração sem incluir dados das amostras desconhecidas. Posteriormente é realizado a etapa da escolha do número de variáveis latentes, que normalmente é realizado por um procedimento de validação cruzada, onde cada amostra é retirada do conjunto de calibração e, sua concentração é prevista usando as amostras restantes, implementada para estimar a concentração através da **Equação 3**, descrita na **Seção 2.4** (S. A. Bortolato et al., 2010; de la Peña et al., 2015; Olivieri e Escandar, 2000).

O conjunto de calibração e validação foram divididos em quatro regiões, como mostrado no pré-tratamento dos dados, onde a primeira continha apenas o CBZ, a segunda TBZ e FBZ, a terceira CBF e a quarta região com CBR, FLT e NFT. Com isso, o número de variáveis latentes (VL) diversificam de acordo como número de constituintes em cada região. Serão avaliados os modelos que foram gerados antes e após o alinhamento e aqui serão discutidos os resultados que esse pré-processamento apresentou.

Inicialmente analisou-se o PRESS, somatório quadrático do erro de predição (do inglês: predicted error sum of squares), que indicou um número de variáveis latentes maior do que a prevista para cada região dividida anteriormente, podendo ser observado no gráfico apresentado na **Figura 22**, que mostra o PRESS versus o número de fatores. É possível ver que esse valor reduz e, posteriormente, volta a aumentar. O que indica que adição de variáveis latentes pode estar se referindo ao ruído instrumental e não aos efeitos químicos verdadeiros. Intuitivamente é selecionado um número ótimo correspondente ao PRESS mínimo. Contudo, pode haver alguma incerteza envolvida na escolha, e o conhecimento sobre seu sistema também deve ser levado em consideração, como exemplo, presença dos analitos por região, bem como os perfis espectrais e tempos de retenção. Esse resultado pode ser justificado levando em consideração as características espectrais nas amostras selecionadas.

Figura 22 - Gráfico do número de PRESS (somatório quadrático do erro de predição) versus o número de fatores ou variáveis latentes. CBZ (—), TBZ (—), FBZ (—), CBF (—), CBR (—), FLT (—), NFT (—).



Para este conjunto de dados, o número de fatores ideal não acorda com o número de variáveis correspondentes aos constituintes presentes na calibração. A variância explicada maior do que 99% e probabilidade menor do que 0,75 só é visto quando o UPLS é realizado com o número de fatores mostrados na **Figura 22**.

Desta forma, os dados foram obtidos com o número de variáveis latentes escolhidas pelo PLS e as variáveis correspondentes ao número de constituintes, levando em consideração o conhecimento químico do sistema, que são apresentados na **Tabela 5**.

Observando os dados da tabela pode-se inferir que resultados mais satisfatórios para a variância explicada e ajuste residual, são encontrados quando utilizamos o número de variáveis latentes indicado pelo PRESS do modelo UPLS, e não se baseando na composição química do sistema.

Melhores resultados do erro relativo de predição – REP (do inglês: Relative Error of Prediction) foram encontrados para o modelo tomando como base o conhecimento da constituição do sistema (analitos de cada região) com valores de: 8,81%, 38,91%, 20,27%, 12,41%, 35,50%, 42,60%, 26,44%, encontrados para CBZ, TBZ, FBZ, CBF, CBR, FLT e NFT, respectivamente. Modelos com valores pequenos de PRESS são melhores candidatos para prever respostas nas medidas. É possível observar que TBZ, FBZ, CBF, FLT e NFT, houve um erro de predição elevado, e isso pode ter ocorrido pelo fato do modelo gerado levar em

consideração a recuperação do próprio perfil do analito ou o perfil do constituinte coeluído, quando se tem a presença de mais de um analito por região.

Tabela 5 – Variância explicada e ajuste residual para os modelos construídos com base no conhecimento químico e construídos pelo PRESS do UPLS.

V. Exp (x)		V. Exp (y)	Res. (x)	Res. (y)	VL	V. Exp (x)	V. Exp (y)	Res. (x)	Res. (y)	VL
Modelo gerado com base no PRESS DO UPLS						Modelo gerado com base na composição do sistema				
CBZ	99,9865	99,9985	0,7712	0,0363	4	92,6836	97,5551	17,9737	1,4458	1
TBZ	99,7491	99,9654	4,7568	0,172	3	98,8165	99,7065	10,3308	0,5009	2
FBZ	99,7491	99,9654	4,7568	0,172	3	98,8165	99,7065	10,3308	0,5009	2
CBF	84,5526	99,8119	16,8792	0,2593	2	82,0246	99,308	18,208	0,4974	1
CBR	99,9904	99,8672	0,957	0,1347	4	99,8412	99,7026	3,8849	0,2015	3
FLT	96,9326	99,8493	17,0765	0,5654	2	99,8412	99,9554	3,8858	0,3076	3
NFT	99,9904	99,8672	0,957	0,1347	4	99,842	99,9555	3,8757	0,1513	3

V. Exp. (x) - Variância explicada da matriz de dados; V. Exp. (y) - Variância explicada do vetor de resposta; Res (x) e (y) - Ajuste da matriz de dados e do vetor de resposta, respectivamente.

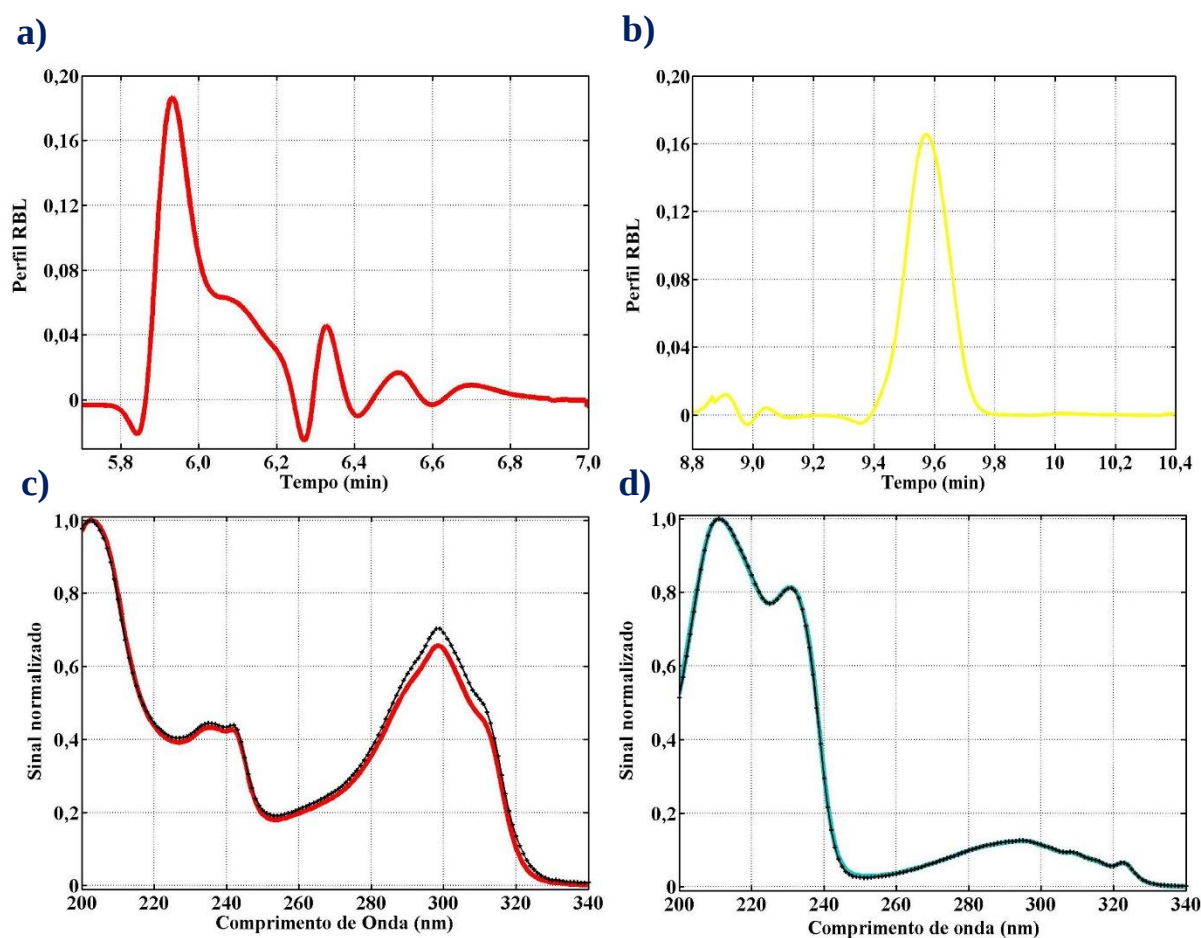
Outro fator que contribui para que os resultados não sejam satisfatórios pode estar relacionado à variação do tempo de retenção. Essa flexibilidade acentuada pode prejudicar o modelo quando se utiliza as variáveis latentes nos dados desdobrados (S. A. Bortolato et al., 2010; de la Peña et al., 2015; Montemurro et al., 2016).

O número ideal de variáveis latentes deve estar próximo do número conhecido ou suspeito de constituintes químicos no conjunto de calibração, isto é, aqueles que produzem sinais mensuráveis. Fenômenos adicionais que causam variações instrumentais de amostra para amostra, como desvios da linha de base, não linearidades, interações etc., podem contribuir com variáveis latentes adicionais para o valor geral de variáveis. Em suma, o valor ideal deve sempre ser passível de alguma interpretação razoável dos componentes químicos (Olivieri e Escandar, 2000).

Uma condição importante que pode ser usado no UPLS é a etapa de RBL, utilizada para minimizar a norma de um resíduo encontrado, enquanto ajusta os dados devido a contribuição de sinais não modelados, reconhecidos como interferentes. Neste caso, não foi utilizado essa etapa, visto que, embora haja a presença e sobreposição entre os analitos da região II e IV, estes

analitos já estão presentes tanto no conjunto de calibração, quanto no conjunto de teste (ou validação), não havendo a necessidade de recuperar o perfil de outro analito no RBL, como interferente, já que foram modelados juntos anteriormente na etapa de calibração. Na **Figura 23** é apresentado o perfil recuperado quando se emprega a etapa de RBL nos casos onde ocorre a coeluição. Em TBZ (vermelho) o perfil de eluição e espectral mostram que o próprio analito é recuperado no resíduo, e em CBR (amarelo) ocorre a recuperação do perfil de NFT (ciano). O que não condiz com o modelo gerado, já que esses analitos fazem parte do conjunto de calibração e teste.

Figura 23 - Perfis recuperados da amostra 7 do conjunto de validação (aplicação do RBL no modo de eluição e espectrais. Em **a)** Perfil de eluição de TBZ; **b)** Perfil de eluição de CBR e **c) e d)** são apresentados os perfis espectrais de TBZ e NFT em linhas pontilhadas pretas (—●—●—●), e em cores (vermelho e ciano), os perfis reais desses analitos. TBZ (—), CBR (—), NFT (—).



Observando esses valores e tendo realizado estudos de pré-processamento foi possível gerar um modelo do UPLS utilizando o alinhamento *coshift*, discutido anteriormente na **Seção 4.2**.

Para este caso, serão expressos apenas os resultados na **Tabela 6**, da variância explicada com o número de variáveis latentes correspondentes ao número de constituintes presentes em cada região em que os dados foram subdivididos.

Tabela 6 - Variância explicada e ajuste residual do modelo construído com base na composição química do sistema.

	V. Exp (x)	V. Exp (y)	Res. (x)	Res. (y)
CARBENDAZIM	98,6637	98,8461	7,6813	0,9933
TIABENDAZOL	99,7279	99,9074	4,7738	0,2814
FUBERIDAZOL	99,7279	99,9074	4,7738	0,2814
CARBOFURAN	99,4891	99,8459	3,0698	0,2347
CARBARIL	99,8629	99,9062	3,7205	0,1132
FLUTRIAFOL	99,8403	99,9817	4,0151	0,1968
NAFTOL	99,8420	99,9555	3,8757	0,1513

*V. Exp. (x) - Variância explicada da matriz de dados; V. Exp. (y) - Variância explicada do vetor de resposta; Res (x) e (y) - Ajuste da matriz de dados e do vetor de resposta, respectivamente.

É possível avaliar que houve uma redução do ajuste residual, tanto na matriz de dados como no vetor de resposta. Com esses resultados houve melhora nos valores do REP, contudo, as regiões que apresentavam analitos coeluídos não obtiveram resultados satisfatórios, REP inferior a 10%, com TBZ e FBZ com erros de predição de 41,3% e 23,76% e a região IV, contendo NFT, com REP de 22,13% e FLT, que apresentou erro de 33,95%. Isso pode estar relacionado à coexistência dos perfis cromatográficos, fazendo com que os sinais dos analitos sejam confundidos, principalmente para os casos de TBZ e FBZ, onde os perfis espectrais são semelhantes e as concentrações são distintas apenas no conjunto de validação, devido ao planejamento de misturas. Os valores de REP são classificados como excelente (menos de 2%), satisfatório (2–10%), e ruim (maior que 10%) (Olivieri e Escandar, 2000).

Mesmo com etapa de RBL nos dados alinhados ou com o número de variáveis latentes indicadas pelo PRESS, os resultados ainda foram mais satisfatórios do que os que levam em consideração o número de fatores que corresponde ao número de constituintes em cada região. Desta forma, os resultados encontrados para essa escolha são mostrados na **Tabela 7**, onde são apresentadas as métricas de desempenho para esse modelo gerado.

Quando os analitos estão não coeluídos, as métricas de desempenho são mais satisfatórias, com REP inferior a 10%, onde maiores sensibilidades analíticas podem ser vistas. Contudo, mesmo com esses desempenhos satisfatórios para CBZ, CBF e CBR, que embora esteja em uma região junto a outros analitos não está coeluído. Os valores de LOD e LOQ máximos são superiores às concentrações mais baixas do conjunto de calibração e validação, com faixa de concentração: 0,05 a 18,00 mg L⁻¹ para CBZ, TBZ e FBZ; 0,05 a 11,0 mg L⁻¹ para CBF; de 0,05 a 7,0 mg mL⁻¹ para CBR; de 0,05 para 13,0 mg L⁻¹ para NFT e de 0,05 a 28,0 mg L⁻¹ para FLT. Isso pode estar associado aos resíduos que pode conter perfis dos constituintes não modelados corretamente.

Tabela 7 - Métricas de desempenho analítico para o modelo UPLS-RBL com dados alinhados.

Métricas de desempenho UPLS - RBL	CBZ	TBZ	FBZ	CBF	CBR	NFT	FLT
RMSEP (mg L ⁻¹)	0,42	3,71	2,13	0,46	0,30	3,09	2,20
REP (%)	4,71	41,36	23,76	8,49	8,64	22,13	33,95
SEN (L mg ⁻¹)	1551	1948,8	1948,8	1236,7	2521,3	732,124	1788,3
γ (L mg ⁻¹)	419,69	284,03	284,03	911,56	219,32	52,14	115,48
LOD _{min} (mg L ⁻¹)	0,01	0,04	0,04	0,004	0,02	0,09	0,04
LOD _{max} (mg L ⁻¹)	1,02	0,66	0,66	0,10	0,27	0,49	0,50
LOQ _{min} (mg L ⁻¹)	0,04	0,11	0,11	0,01	0,06	0,27	0,12
LOQ _{max} (mg L ⁻¹)	3,06	1,97	1,97	0,31	0,81	1,47	1,51

RMSEP- Raiz quadrada do erro médio de predição (do inglês: Root Mean Square Error of Prediction); REP – Erro relativo de predição (do inglês: Relative error of prediction); γ – Sensibilidade analítica; LOD_{max} e LOD_{min} – Limites de detecção máximo e mínimo, respectivamente; LOQ_{max} e LOQ_{min} – Limites de quantificação máximo e mínimo, que correspondem às amostras de calibração com as menores e maiores influências extrapoladas para concentração zero do analito (Allegri e Olivieri, 2014).

Embora esse modelo multivariado seja flexível, permitindo a variação temporal e aplicando-o diretamente em dados brutos desalinhados a sua capacidade de previsão, mostrou-se insuficiente para o conjunto de amostras, colocando em questão a potencialidade da modelagem com relação às variações do tempo. Com isso, o alinhamento seria uma boa alternativa para suprir essa diferença temporal e auxiliar na modelagem dos pequenos desvios de trilinearidade que podem permanecer após essa etapa de pré-processamento.

Uma justificativa para falha nesses resultados é consequência do modelo UPLS trabalhar com cargas abstratas, que não fornecem informações químicas reconhecíveis, construídas por combinações lineares de perfis verdadeiros. O que pode ocasionar a não exatidão dos dados mesmo quando ocorre o alinhamento, mas ocorre a sobreposição dos picos.

4.4 Calibração utilizando MCR - ALS

Os dados gerados utilizando o HPLC-DAD são dados de segunda ordem, tendo uma dimensão construída pelo perfil cromatográfico (tempo de eluição) e outra dimensão pelo perfil espectral. Neste trabalho o perfil espectral estabelecido foi de 200 - 340 nm, com espectros informativos que possuem uma boa resposta nesses comprimentos de onda. As variáveis do tempo de retenção (**j**) foram escolhidas de acordo com as regiões discutidas anteriormente, sendo divididas em quatro, para facilitar a convergência do cálculo. Para **I** amostras, no caso do conjunto de validação ou predição, 17 amostras, a matriz de três vias ($17 \times j \times 140$) é obtida como uma Matriz **D**, aumentada, na direção do tempo de eluição.

Os dados para o MCR foram processados com alinhamento e sem o alinhamento, contudo, não houve diferenças significativas nos resultados. A fim de avaliar essa resposta foram utilizadas ferramentas estatísticas para o teste de hipótese, com avaliação através dos testes **P** e **t**-pareado (Student) que leva em consideração a um nível de 95% de confiança. Se a hipótese for nula (igualdade entre as quantidades observadas), pode ser considerada ou rejeitada (Skoog, Holler e Nieman, 2002). Embora o teste **t** seja robusto e não seja muito sensível a variações dessa suposição, o teste **P** confirma, por meio das variâncias, que quando os valores são maiores do que o nível de significância (0,05%), a hipótese de igualdade deve ser levada em consideração para os conjuntos de calibração e validação. Na **Tabela 8** será apresentada os dados referentes aos testes **t** e **P**, antes e após o alinhamento.

Os resultados apontam que não há diferença estatisticamente significativa entre os números apresentados para esse pré-processamento, contudo, para as amostras de hortaliças, o alinhamento poderá ser viável, tendo em vista a grande quantidade de constituintes inesperados respondendo juntamente com os analitos, o que pode facilitar a identificação dos perfis espectrais e temporais pelo MCR – ALS.

Tabela 8 - Avaliação de similaridade estatística dos valores de predição do MCR-ALS, antes e após alinhamento com coshift.

	CBZ	TBZ	FBZ	CBF	CBR	NFT	FLT
t	1,154	1,014	-2,096	2,086	-0,465	-1,506	0,264
P	0,265	0,326	0,052	0,053	0,648	0,152	0,795
Número de Graus de liberdade = 16							
t crítico = 2,12							
P = 0,05 (95%)							

Antes da aplicação do MCR é preciso estimar o número de componentes utilizando a análise de componentes principais, recorrendo a uma análise de SVD (do inglês: *Singular Value Decomposition*) e a variância explicada com cada componente para determinar um número ótimo. A **Tabela 9** lista o ajuste residual para o número dos componentes principais e a variância explicada de 5 componentes no conjunto de validação. Em termos dos dois parâmetros, o número dos componentes principais foi inicialmente determinado para cada região contendo os analitos.

Tabela 9 - Resultado da variância explicada e do ajuste residual em função das componentes adicionadas no conjunto de validação por MCR-ALS.

	CBZ		TBZ - FBZ		CBF		CBR - FLT - NFT	
COMP*	VAR ¹	RES ²	VAR ¹	RES ²	VAR ¹	RES ²	VAR ¹	RES ²
1	99,9988	0,2079	94,1986	20,4607	99,9699	0,6656	91,0739	26,9968
2	0,0007	0,1327	5,7992	0,3979	0,0232	0,3207	5,1417	17,6422
3	0,0002	0,1023	0,0016	0,2037	0,0032	0,2349	3,7814	0,4922
4	0,0001	0,0785	0,0003	0,1521	0,0021	0,1564	0,0016	0,3360
5	0,0001	0,0596	0,0001	0,1120	0,0007	0,1206	0,00066	0,2419

*número de componentes principais, 1- variância explicada da matriz de dados, 2- ajuste residual.

Observando a **Tabela 9** é possível inferir que, para a primeira e terceira região, que contemplam os analitos CBZ e CBR, respectivamente, a variância explicada foi acima de 99%

e o ajuste residual não apresenta variação significativa na primeira componente (PC). Contudo, para as outras duas regiões, II e IV, o número de componentes variou. No caso da região II, que contempla o TBZ e FBZ, foram necessários 2 componentes para explicar o modelo, e o ajuste residual também variou expressivamente da primeira para a segunda componente, não havendo variação significativa a partir dessa segunda PC. No caso da região III, que contém CBR, FLT e NFT, a variância explicada próxima a 100% e ajuste residual não variante quando o modelo é explicado por três componentes.

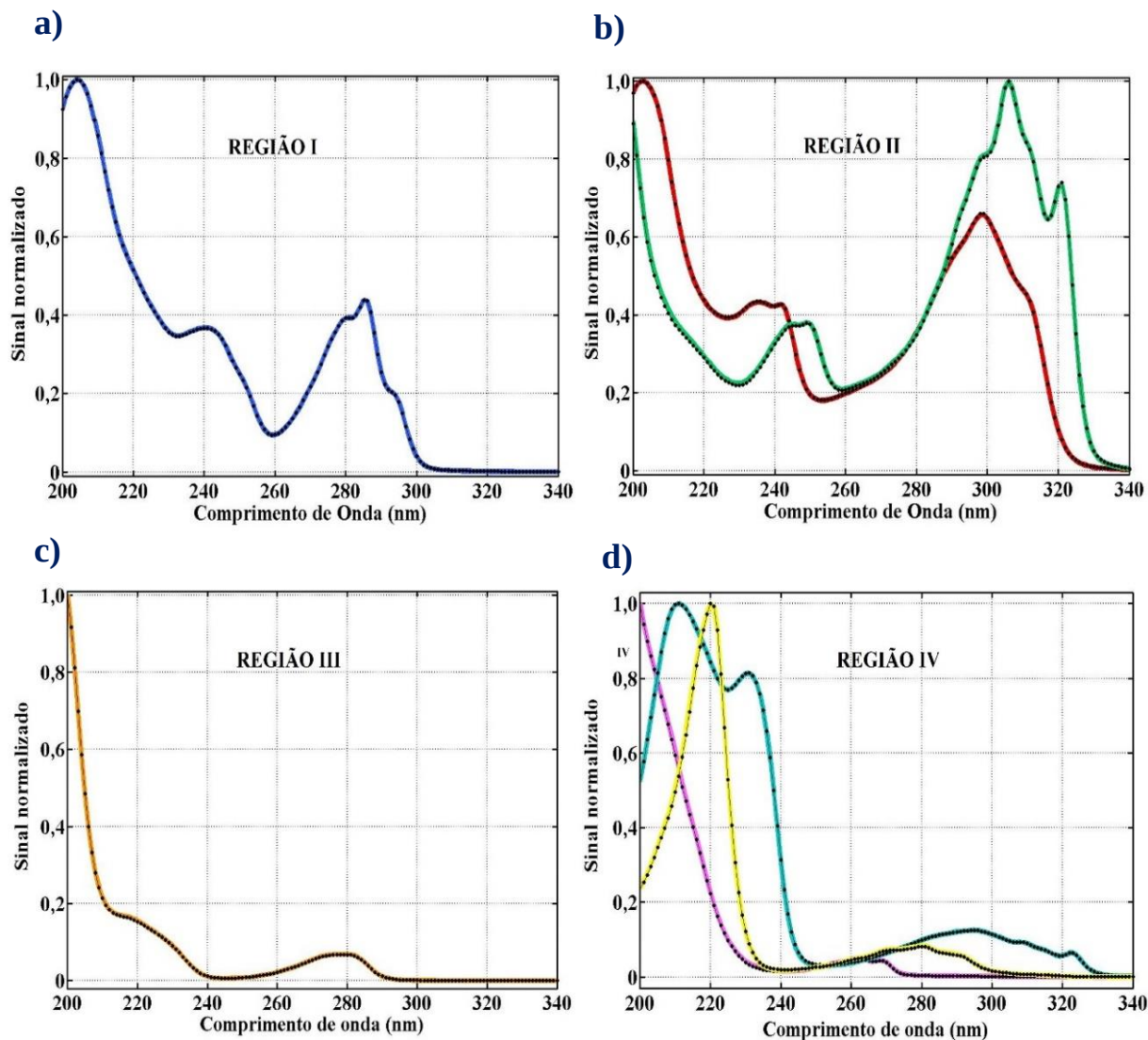
Todos os resultados obtidos na estimativa do número de componentes das regiões indicaram que o posto químico é igual ao posto matemático e condiz com a presença dos analitos em cada região.

Após estimar e definir o número ótimo de PCs, foram aplicadas restrições necessárias para otimização do ALS a fim de reduzir a ambiguidade rotacional, ocasionado pelas diversas possibilidades de descrever a matriz D através de C e S^T , descrito na equação 5 da [Seção 2.5](#), e obter perfis espectrais quimicamente interpretáveis. Dessa forma, três restrições **forma** aplicadas: a) não negatividade nos perfis espectrais e cromatográficos; b) unimodalidade, aplicado apenas aos perfis de concentração (cromatográfico); c) correspondência entre as espécies, utilizada para informar ao algoritmo quais os constituintes estão ou não presentes no conjunto de calibração e d) normalização dos espectros realizada pela norma de frobenius ([de la Peña et al, 2015](#); [Escandar et al., 2014](#); [Março et al, 2014](#)).

Para realizar o tratamento com MCR-ALS, cada amostra ou matriz do conjunto de calibração foram aumentadas no modo de eluição e, em seguida, submetidas à estimativa inicial dos perfis de cada constituinte, através da seleção de variáveis puras, baseado no SIMPLISMA, que visa selecionar linhas ou colunas mais diferentes em um conjunto de dados, fornecendo estimativas de espectros ou perfis de concentração de acordo com a escolha do modo aumentado ([de la Peña et al, 2015](#)).

A **Figura 24 a - d** apresenta a estimativa inicial, com base nas variáveis puras dos perfis espectrais das quatro regiões (em cor), e ainda apresenta os perfis reais dos constituintes de cada região sobrepostos (linha pontilhada preta) aos perfis recuperados.

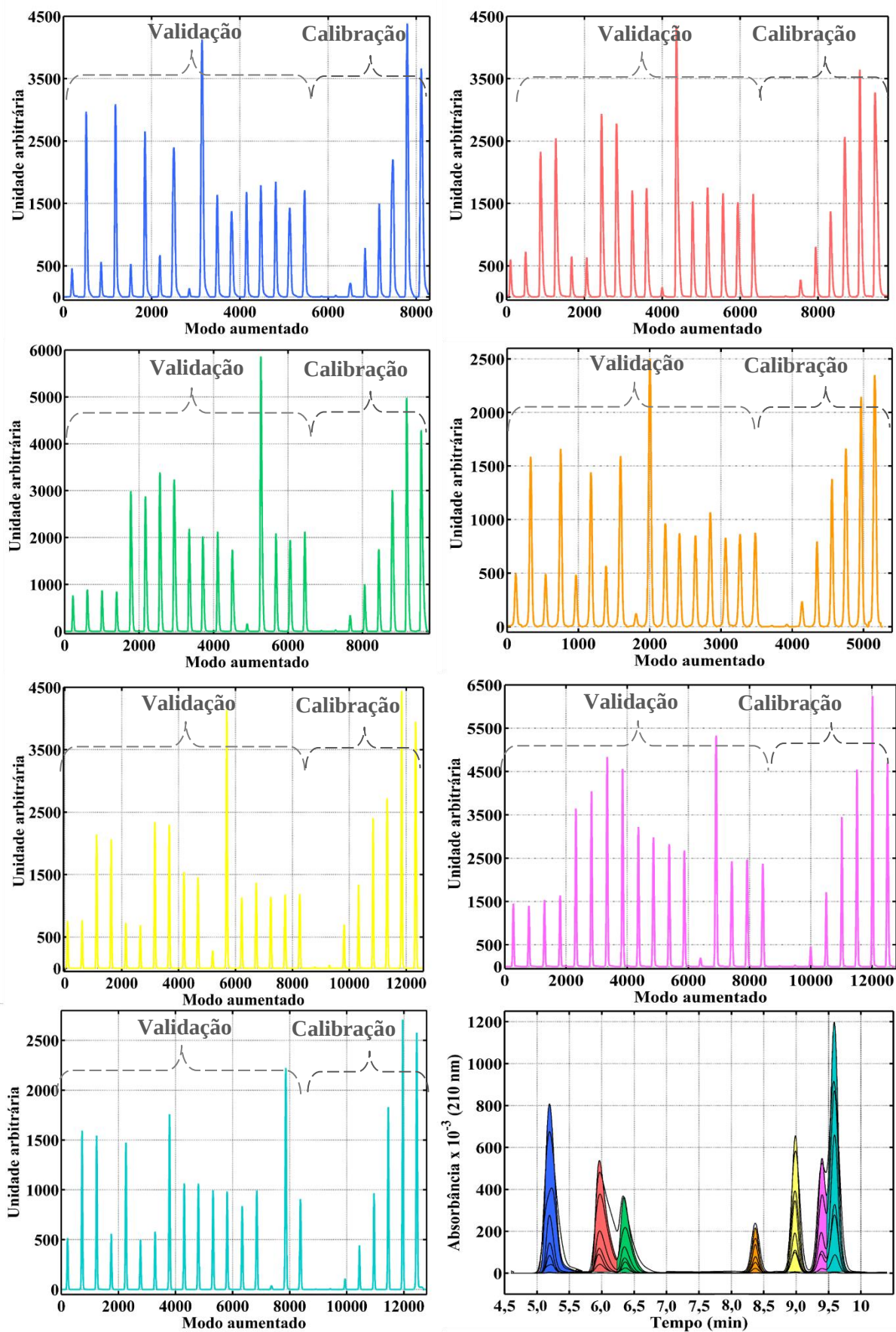
Figura 24 - Perfis espectrais recuperados pelo MCR-ALS em **a)** Região I (CBZ), **b)** Região II (TBZ e FBZ), **c)** Região III (CBF) e **d)** Região IV (CBR, FLT e NFT), CBZ (—), TBZ (—), FBZ (—), CBF (—), CBR (—), FLT (—), NFT (—), Perfis espectrais reais dos constituintes sobreposto ao perfil recuperado MCR (—●—●—●).



Os perfis obtidos pelo SIMPLISMA com os números de componentes estimados anteriormente, tendo 99% da variância explicada, guardam grande semelhança com os perfis reais dos constituintes de cada região. Os perfis de eluição (concentração), que sofrem a quebra da trilinearidade e são aumentados, também são obtidos por esse método, e apresentam sinais de concentração das 17 amostras do conjunto de validação e 8 do conjunto de calibração, posicionadas lado a lado (destacados por colchetes em cinza), como foi mostrado na **Figura 25 a - g**, o que confirmam que a calibração usando MCR-ALS pode ser bem-sucedida.

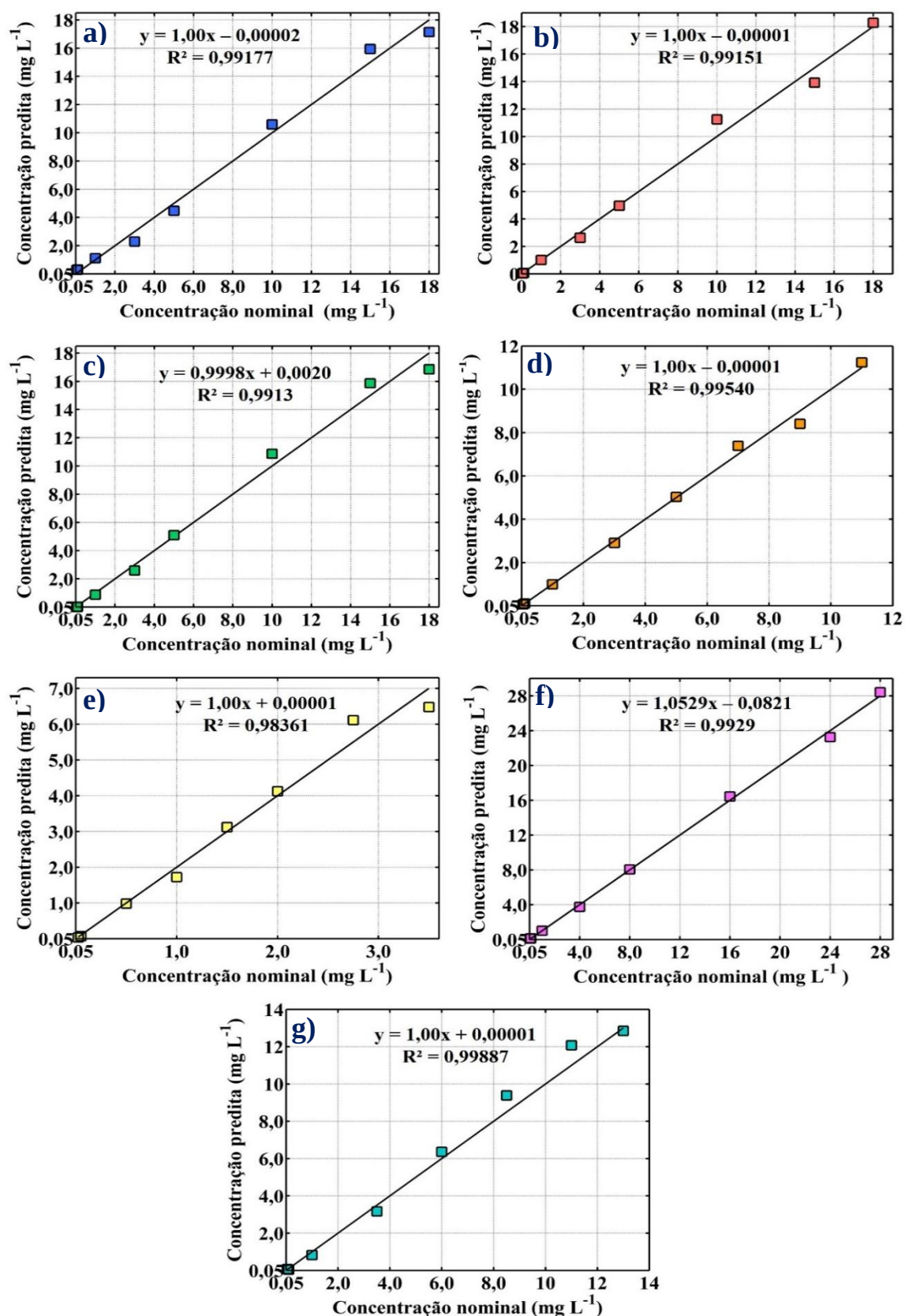
É possível observar que a última concentração do conjunto de calibração (à direita) possui intensidade menor, e isso ocorre devido ao alargamento de pico, como mostrado na **Figura 25 h**.

Figura 25 - Perfis de concentração recuperados pelo MCR-ALS em **a) CBZ**, **b) TBZ**, **c) FBZ**, **d) CBF**, **e) CBR**, **f) FLT**, **g) NFT** e **h)** Perfil de eluição mostrando o alargamento de pico que ocorre na amostra 8 de calibração CBZ (—), TBZ (—), FBZ (—), CBF (—), CBR (—), FLT (—) e NFT (—).



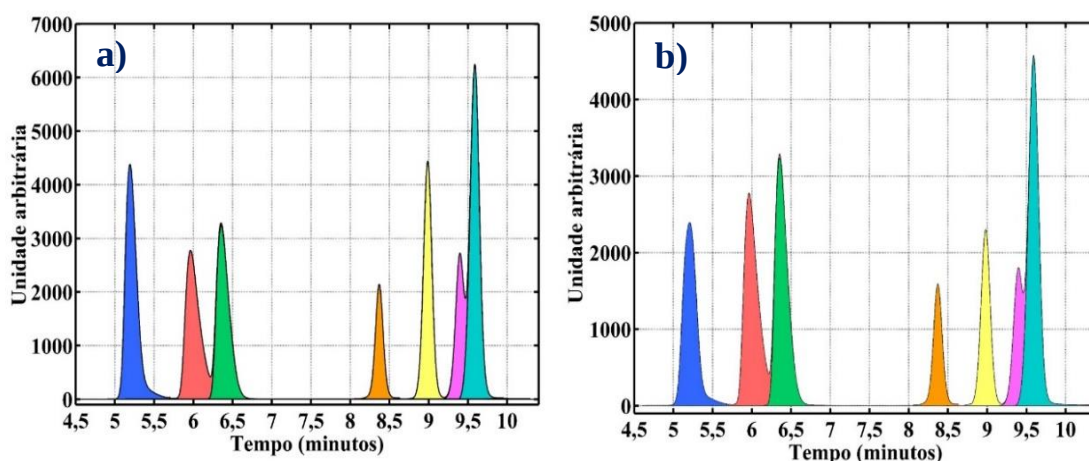
Mesmo com esses alargamentos, o MCR consegue recuperar os perfis e as concentrações de cada constituinte. Na **Figura 26 a - g** são apresentados as regressões de cada analito do conjunto de calibração recuperados pelo MCR-ALS.

Figura 26 - Concentração predita versus nominal das amostras de calibração em: **a)** CBZ (■), **b)** TBZ (■), **c)** FBZ (■), **d)** CBF (■), **e)** CBR (■), **f)** FLT (■) e **g)** NFT (■).



Na etapa seguinte, o ALS é iniciado até à convergência, onde são obtidos os perfis finais dos analitos de cada região ou dos possíveis interferentes que estão presentes durante a etapa de calibração. Nesse caso, tanto o conjunto de calibração quanto o conjunto de validação possuem os mesmos analitos, e não ocorre a presença de constituintes distintos, o que justifica o número de componentes escolhidos em cada região definida anteriormente. Quando se estima a concentração com um número a mais de componentes, do que o definido para cada região, um perfil não aleatório é encontrado, o que confirma que o número correto de PCs é correspondente ao número de constituintes presentes em cada região. Na **Figura 27 a e b** é apresentado os perfis recuperados pelo ALS da amostra 7 do conjunto de calibração e amostra 8 do conjunto de validação ou teste, respectivamente, com o número de componentes escolhidas.

Figura 27 - Perfis de concentração recuperados **a)** amostra de calibração 7 e **b)** amostra de validação 8 com o número de componentes escolhidas para cada região, CBZ (—), TBZ (—), FBZ (—), CBF (—), CBR (—), FLT (—), NFT (—).



Os perfis recuperados foram semelhantes e a convergência foi alcançada com menos de 10 interações para todas as amostras de validação (teste). Então, foi possível obter as concentrações através da calibração, denominada de pseudo-univariada, onde os perfis espectrais são normalizados e a área dos perfis de concentração ou eluição de cada analito é medida para construir o modelo de calibração. A predição de cada amostra de validação é feita interpolando a área do perfil de concentração recuperado na curva de calibração pseudo-univariada.

A **Figura 28 a - g** mostra as predições das dezessete amostras de validação comparadas aos valores nominais. Na **Figura 28 h** é mostrado a elipse de confiança conjunta (EJCR), indicando que, à 95% de confiança, os modelos construídos foram capazes de prever os sete

resíduos de pesticidas indicados pela elipse de confiança (EJCR). Na **Tabela 10** são apresentados os resultados nominais e de predição.

Figura 28 - Concentração predita versus nominal das amostras de validação (teste) em: **a)** CBZ (●), **b)** TBZ (●), **c)** FBZ (●), **d)** CBF (●), **e)** CBR (●), **f)** FLT (●) e **g)** NFT (●). Em **h)** elipse de confiança (EJCR) representados com as cores de cada analito.

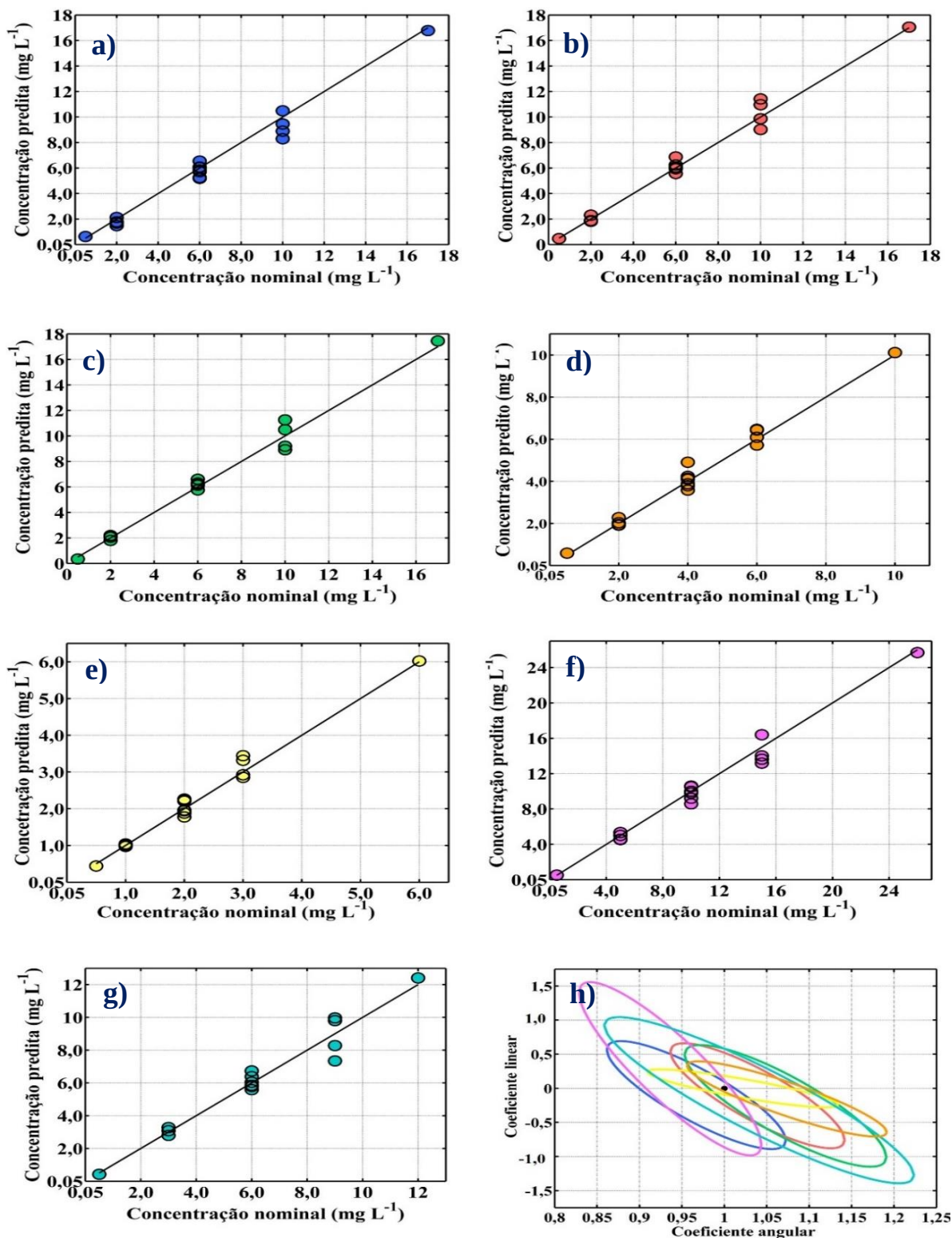


Tabela 10 - Resultados do MCR-ALS para a previsão dos analitos estudados no conjunto de validação.

	CBZ		TBZ		FBZ		CBF		CBR		FLT		NFT	
AM ^a	N ^b	P ^c	N ^b	P ^c	N ^b	P ^c	N ^b	P ^c	N ^b	P ^c	N ^b	P ^c	N ^b	P ^c
1	2,0	1,48 ± 0,31	2,0	1,82 ± 0,29	2,0	1,80 ± 0,31	2,0	2,01 ± 0,13	1,0	1,03 ± 0,16	5,0	4,54 ± 0,16	3,0	2,80 ± 0,36
2	10,0	8,89 ± 0,26	2,0	2,31 ± 0,28	2,0	2,19 ± 0,3	6,0	5,95 ± 0,12	1,0	1,04 ± 0,16	15,0	14,06 ± 0,15	3,0	2,71 ± 0,36
3	2,0	1,78 ± 0,3	10,0	9,03 ± 0,25	2,0	2,13 ± 0,3	2,0	1,97 ± 0,13	3,0	2,92 ± 0,12	15,0	14,53 ± 0,15	3,0	3,00 ± 0,35
4	10,0	9,45 ± 0,27	10,0	9,87 ± 0,26	2,0	2,06 ± 0,3	6,0	6,29 ± 0,12	3,0	2,87 ± 0,12	5,0	5,02 ± 0,16	3,0	3,22 ± 0,34
5	2,00	1,68 ± 0,3	2,0	1,88 ± 0,29	10,0	9,20 ± 0,27	2,0	1,93 ± 0,13	1,0	1,00 ± 0,16	15,0	14,19 ± 0,15	9,0	7,33 ± 0,34
6	10,0	8,29 ± 0,25	2,0	1,87 ± 0,29	10,0	8,91 ± 0,27	6,0	5,72 ± 0,11	1,0	0,98 ± 0,16	5,0	4,58 ± 0,16	9,0	8,29 ± 0,37
7	2,0	2,12 ± 0,29	10,0	10,97 ± 0,28	10,0	10,49 ± 0,29	2,0	2,30 ± 0,13	3,0	3,28 ± 0,13	5,0	5,34 ± 0,16	9,0	10,01 ± 0,44
8	10,0	10,49 ± 0,29	10,0	11,42 ± 0,29	10,0	11,27 ± 0,31	6,0	6,54 ± 0,13	3,0	3,44 ± 0,13	15,0	16,40 ± 0,17	9,0	9,80 ± 0,43
9	0,50	0,63 ± 0,33	6,0	6,07 ± 0,24	6,0	6,60 ± 0,25	0,50	0,59 ± 0,15	2,0	2,21 ± 0,13	10,0	9,81 ± 0,15	6,0	6,70 ± 0,33
10	17,0	16,78 ± 0,45	6,0	6,87 ± 0,24	6,0	6,28 ± 0,25	10,0	11,09 ± 0,21	2,0	2,26 ± 0,13	10,0	10,59 ± 0,15	6,0	6,76 ± 0,33
11	6,0	5,19 ± 0,25	0,50	0,46 ± 0,32	6,0	6,14 ± 0,25	4,0	4,14 ± 0,11	0,50	0,45 ± 0,18	10,0	10,01 ± 0,15	6,0	6,39 ± 0,32
12	6,0	5,71 ± 0,25	17,0	17,53 ± 0,46	6,0	5,77 ± 0,25	4,0	3,58 ± 0,11	6,0	6,02 ± 0,21	10,0	9,22 ± 0,15	6,0	5,60 ± 0,31
13	6,0	5,25 ± 0,25	6,0	5,57 ± 0,24	0,50	0,35 ± 0,35	4,0	3,79 ± 0,11	2,0	1,78 ± 0,14	10,0	8,58 ± 0,15	0,50	0,42 ± 0,46
14	6,0	6,54 ± 0,24	6,0	6,24 ± 0,24	17,0	18,95 ± 0,54	4,0	4,76 ± 0,11	2,0	2,23 ± 0,13	10,0	10,51 ± 0,15	12,0	12,92 ± 0,6
15	6,00	6,04 ± 0,24	6,00	6,02 ± 0,24	6,00	6,17 ± 0,25	4,00	3,88 ± 0,11	2,00	1,88 ± 0,13	0,50	0,52 ± 0,2	6,0	5,93 ± 0,32
16	6,00	6,08 ± 0,24	6,00	5,94 ± 0,24	6,00	6,30 ± 0,25	4,00	4,02 ± 0,11	2,00	1,95 ± 0,13	26,00	23,70 ± 0,24	6,0	6,03 ± 0,32
17	6,00	5,84 ± 0,25	6,00	6,00 ± 0,24	6,00	6,27 ± 0,25	4,00	4,04 ± 0,11	2,00	1,96 ± 0,13	10,00	9,80 ± 0,15	6,0	5,80 ± 0,32

^a AM= amostras, ^b Concentração Nominal, ^c Concentração Predita e o intervalo de confiança, baseado nos erros do tipo I e II, em que ocorre o falso positivo e falso negativo

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i,j} e^2}{I*J}}.$$

Os resultados obtidos são apresentados na **Tabela 11** e, como pode ser visto, o método proposto foi capaz de prever a concentração dos analitos no conjunto teste, que foi avaliada pelos valores de REP(%), variando de 5,09 a 10,18%, além de mostrar-se sensível, pois possuem valores de LOD e LOQ abaixo dos níveis de menor concentração de validação de cada analito (Olivieri, 2014; Olivieri et al, 2009).

Tabela 11 - Métricas de desempenho analítico para o modelo de MCR-ALS.

Métricas de desempenho MCR-ALS	CBZ	TBZ	FBZ	CBF	CBR	FLT	NFT
RMSEP (mg L ⁻¹)	0,63	0,56	0,70	0,39	0,18	0,89	0,66
REP (%)	7,04	6,26	7,79	7,10	5,09	6,22	10,19
SEN (L mg ⁻¹)	810,57	550,44	556,28	666,68	964,56	176,40	711,51
Seletividade	1,00	0,49	0,49	1,00	0,53	0,68	0,47
γ (L mg ⁻¹)	4190,0	740,0	770,0	850,0	1080,0	177,40	779,10
LOD (mg L ⁻¹)	0,00079	0,0044	0,0043	0,00336	0,0031	0,0194	0,0043
LOQ (mg L ⁻¹)	0,0026	0,0134	0,0130	0,0117	0,0093	0,0588	0,0130

RMSEP- Raiz quadrada do erro médio de predição (do inglês: Root mean square error of prediction); REP – Erro relativo de predição (do inglês: Relative error of prediction); γ – Sensibilidade analítica; LOD – Limite de detecção; LOQ – Limite de quantificação (Bauza, Ibañez, Tauler e Olivieri, 2012; Olivieri, 2014).

Com esses resultados é possível inferir que a metodologia proposta, que faz uso da vantagem de segunda ordem, mostra-se adequada para prever constituintes inesperados que ocorrem na quantificação em amostras, ou seja, a etapa de validação foi bem sucedida, conseguindo prever os perfis espectrais e de concentração de cada constituinte presentes nas misturas.

Como esperado, o MCR – ALS mostrou melhor desempenho. Isso já foi discutido anteriormente, e ocorre devido às vantagens que a técnica fornece. A decomposição da matriz em termos de componentes bilineares leva à recuperação dos perfis individuais de componentes puros, na direção do tempo aumentado e no modo espectral. É possível acompanhar os perfis de cada um dos modos e inferir sobre o sistema. Além disso, leva em consideração o deslocamento do perfil do modo temporal e oferece vantagens do uso de restrições capazes de alcançar soluções quimicamente interpretáveis, baseadas apenas em fenômenos fisicamente naturais.

4.5 Amostras de hortaliças

Anteriormente foi discutido qual técnica de calibração de segunda ordem teria melhor desempenho na quantificação dos 7 analitos de resíduos de pesticidas. O desenvolvimento do método envolveu a busca por condições ótimas para uso do equipamento, tais como o estabelecimento de parâmetros, assim como a validação do método, por meio da obtenção de parâmetros de mérito analítico relevantes das técnicas quimiométricas, e etapa de preparo de amostras. Esta última, uma das etapas mais importantes, principalmente em técnicas cromatográficas, permite extrair e separar os analitos e interferentes.

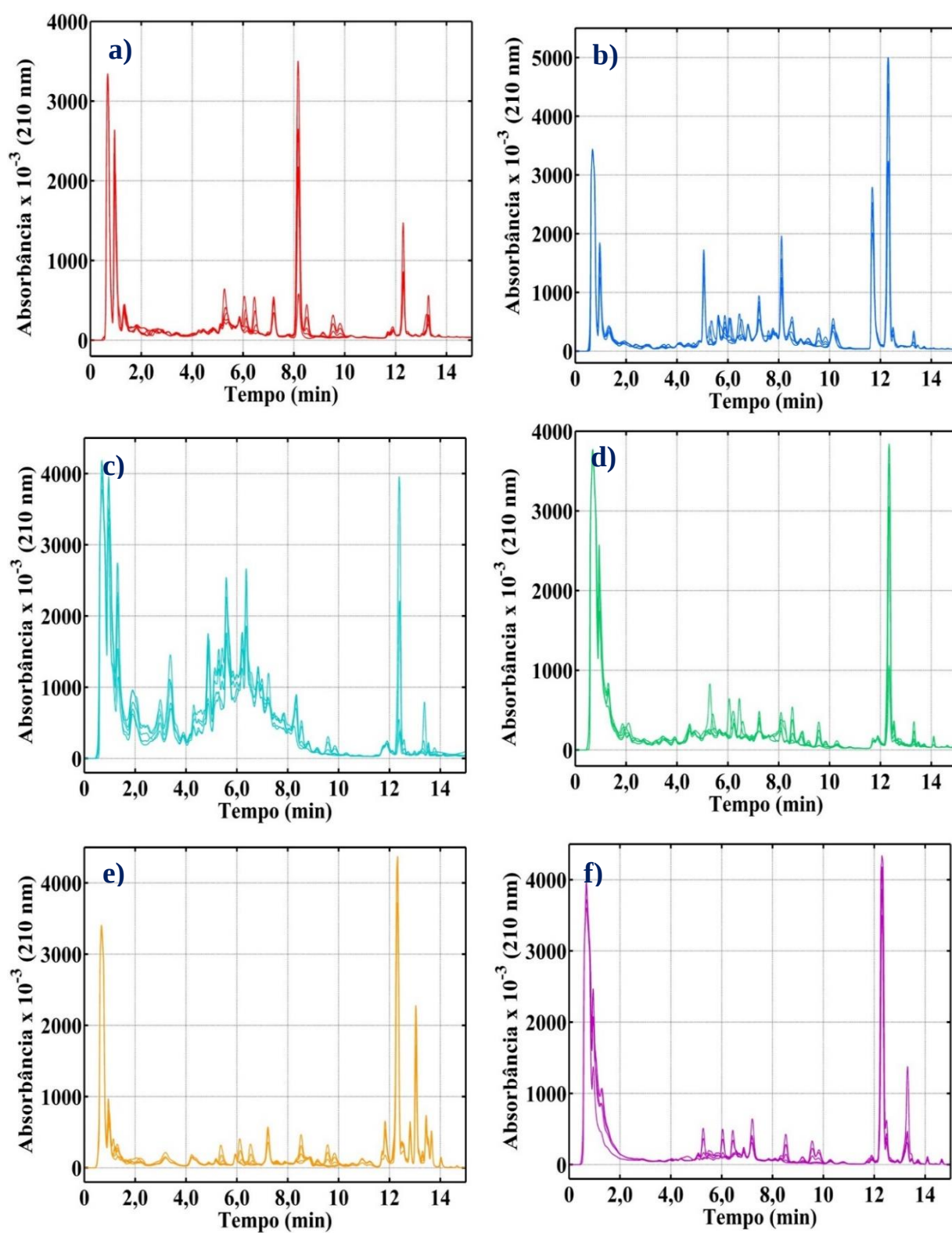
Para a quantificação de resíduos de pesticidas, o método oficial é o QuEChERS, que apesar de eliminar uma grande quantidade de interferentes, ainda pode não ser o suficiente quando se trata do tipo de amostra que se pretende analisar. A realização da análise de amostras de frutas ou hortaliças inteiras favorece no objetivo de quantificar os agrotóxicos, mas, por outro lado, é possível perceber uma grande quantidade de co-extrativos presentes nas amostras, que pode acabar dificultando a interpretação dos resultados ou acabar invalidando a metodologia proposta.

O método proposto utiliza QuEChERS para extração e eluição em gradiente para aumentar o fator de retenção, reduzir o consumo de solvente, diminuir a largura dos picos e acelerar as análises. Tanto os constituintes não esperados quanto a interferência da linha de base foram contornados pelo tratamento de dados por calibração multivias.

A calibração dos constituintes padrões foi satisfatória utilizando a subtração do branco (limpeza quimiométrica) no processamento com MCR – ALS com ou sem alinhamento, contudo, é preciso aplicar esses procedimentos nas amostras de hortaliças para inferir se o modelo construído será útil na quantificação desses resíduos de pesticidas (carbendazim, tiabendazol, fuberidazol, carbofuram carbaril e 1-naftol) nas amostras de tomate, pimentão, couve, alface, cenoura e beterraba. A **Figura 29** apresenta os perfis cromatográficos das seis amostras de hortaliças escolhidas para o estudo, levando em consideração os cinco níveis obtidos para os testes de recuperação e efeito de matriz.

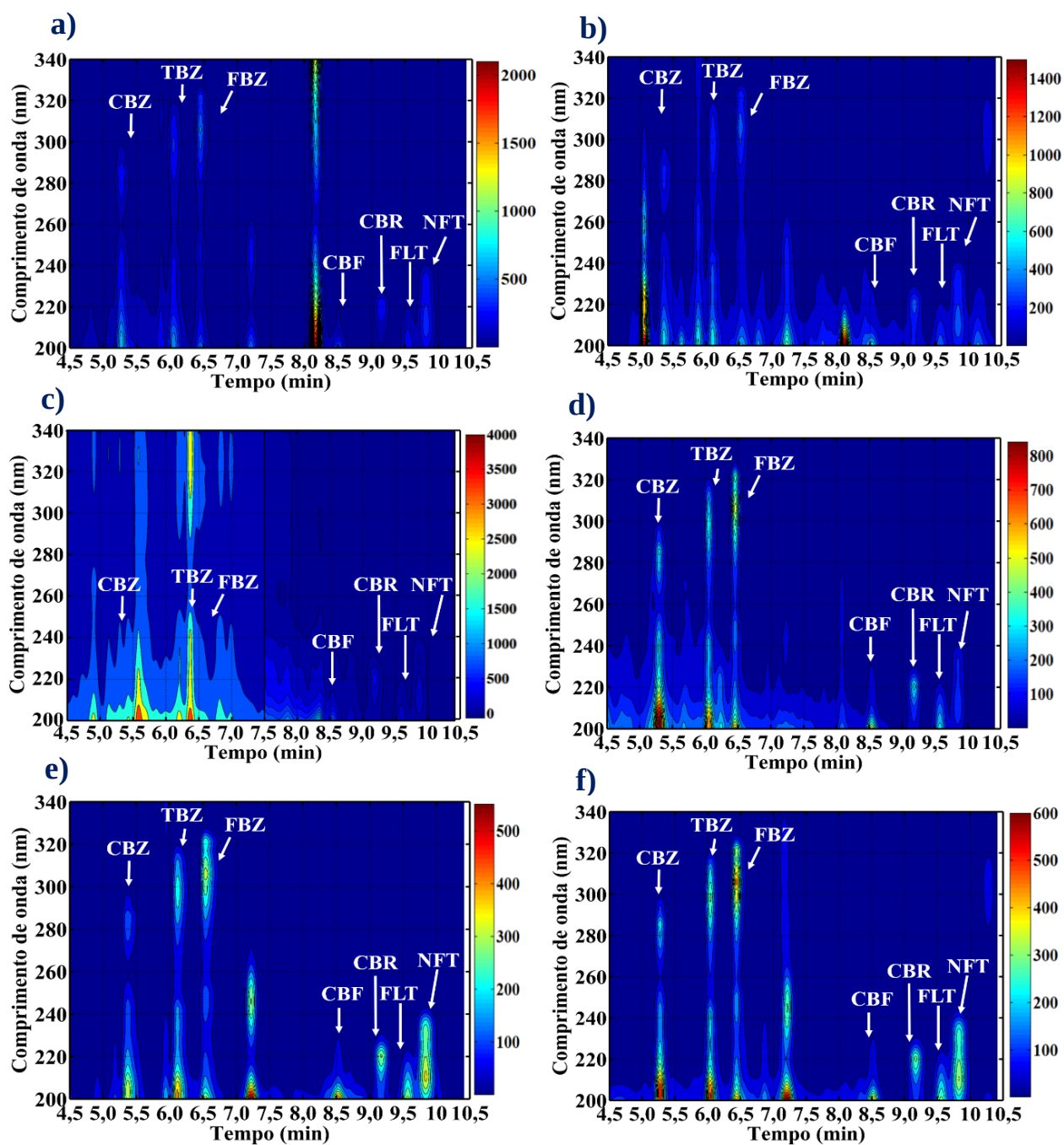
Observando os cromatogramas seria difícil interpretar os picos dos analitos se a etapa de adição de padrão não fosse realizada, principalmente nas amostras de pimentão e couve, que apresentam uma grande quantidade de interferentes. Por esse motivo é de extrema importância realizar inspeção visual antes do tratamento dos dados por técnicas quimiométricas. Isso evita excluir qualquer informação importante, principalmente quando é pretendido reduzir o esforço computacional dividindo os dados em regiões.

Figura 29 - Perfis de eluição cromatográficas das seis amostras de hortaliças representados em cinco níveis de concentração para: **a)** tomate (—), **b)** pimentão (—), **c)** couve (—), **d)** alface (—), **e)** cenoura (—), **f)** beterraba (—), de acordo com Tabela 4 da seção 3.4



A avaliação também consiste na observação das superfícies de contorno de cada amostra, apresentada na **Figura 30**.

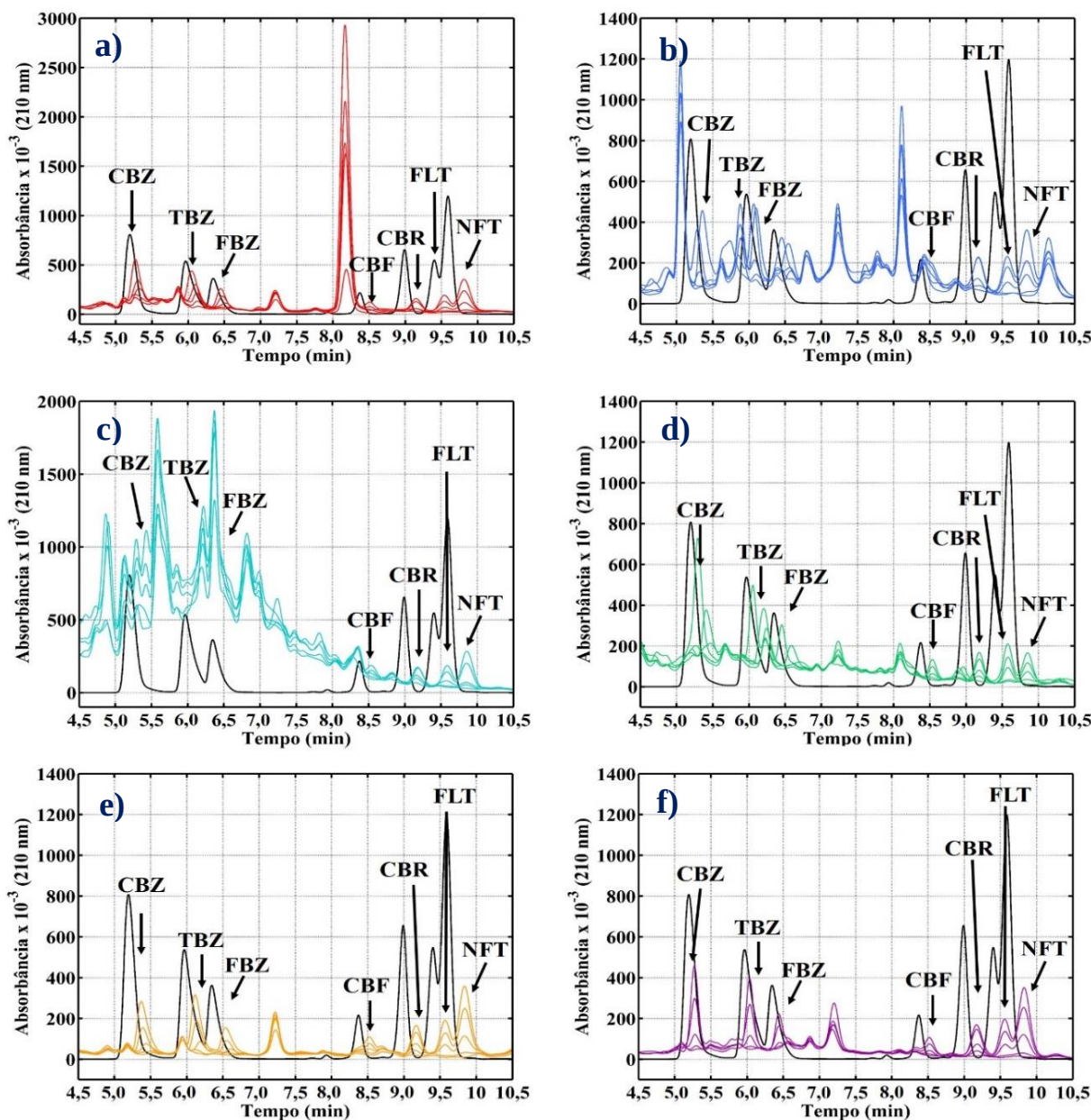
Figura 30 - Perfis de eluição cromatográficas, em superfície de contorno, das seis amostras de hortaliças apresentadas no nível 5 de concentração (10 mg L⁻¹ para CBZ, TBZ e FBZ; 6 mg L⁻¹ para CBF, 3,0 mg L⁻¹ para CBR, e 15 e 9,0 mg L⁻¹ para FLT e NFT, respectivamente), para: **a)** tomate, **b)** pimentão, **c)** couve, **d)** alface, **e)** cenoura e **f)** beterraba.



Como descrito na **Seção 4.1**, foi realizada a subtração dos dados de cada amostra, pelo perfil de eluição do branco a fim de reduzir o efeito ocasionado pela linha de base da eluição

gradiente, já discutida anteriormente. Esse procedimento não é tão eficiente quanto nos conjuntos de calibração e teste, devido às intensidades dos diferentes analitos existentes nas amostras, principalmente, coeluídos aos resíduos de pesticidas de interesse. É importante salientar que na etapa de calibração das técnicas quimiométricas, o posto químico seja igual ao posto matemático para que o modelo não busque recuperar outros perfis existentes nos dados e sobreajustar o modelo. Para o caso dos dados desse estudo, o perfil oriundo da linha de base da eluição gradiente foi solucionado através da subtração do branco, sem essa estratégia o algoritmo poderia se equivocar com esse sinal aditivo e inclui-lo na modelagem. A **Figura 31** apresenta a comparação entre os cromatogramas das amostras das hortaliças e amostra 7 da calibração.

Figura 31 - Perfis de eluição cromatográficas das seis amostras de hortaliças representados em cinco níveis de concentração para: **a)** tomate (—), **b)** pimentão (—), **c)** couve (—), **d)** alface (—), **e)** cenoura (—), **f)** beterraba (—). O perfil cromatográfico da amostra 7 do conjunto de calibração, em preto (—).



4.5.1 Alinhamento das amostras de hortaliças

Observando a **Figura 31** é possível notar a diferença no deslocamento de pico das amostras de hortaliças comparadas à amostra 7 do conjunto de calibração (em preto). Como discutido na **Seção 4.2**, o alinhamento coshift seria uma estratégia útil para facilitar a predição da concentração dos analitos, embora, na **Tabela 8**, os resultados avaliados por testes estatísticos, t e P , para etapa de calibração, não tivessem apresentado diferenças significativas entre as predições das concentrações obtidas antes e após o alinhamento, para o MCR – ALS.

As amostras de hortaliças possuem a presença de inúmeros co-extrativos que podem estar coeluídos aos analitos, neste caso, os resíduos de pesticidas. Com a intenção de facilitar a busca pelos perfis dos analitos nos dados cromatográficos, foi realizado a escolha de divisão por regiões do cromatograma e a utilização do alinhamento. Como discutido anteriormente, para que o alinhamento seja eficiente, os perfis cromatográficos e espectrais não podem sofrer nenhuma alteração, apenas o deslocamento mediante compressão ou alongamento dos dados. O alinhamento coshift apresentou melhor resultado na etapa de calibração, contudo, nas amostras de hortaliças, os perfis cromatográficos apresentaram distorções. A **Figura 32** apresenta o cromatograma em 3D da primeira região das amostras alinhadas. É com essa inspeção que é possível notar que ocorrem falta de informações em alguns comprimentos de onda, apresentando linhas ou superfícies mais espaçadas, indicadas por uma seta vermelha.

Na **Figura 33** é apresentada os alinhamentos dos cromatogramas das amostras em 2D da primeira e segunda região, que corresponde a presença dos analitos carbendazim (CBZ) e tiabendazol (TBZ), fuberidazol (FBZ), respectivamente. É visível e persistente o aparecimento de imperfeições nos cromatogramas, isso representa falta ou quebra de informações em alguns tempos de eluição (cromatogramas em 2D). Nas outras regiões, não apresentadas nas figuras, também ocorreu essas falhas. Esses fatores impedem a utilização dessa estratégia para o processamento dos dados no MCR – ALS, pois a técnica permite a decomposição de uma matriz, que consiste em encontrar os perfis de concentração e espectrais individualmente, permitindo identificar as principais fontes de variação de um determinado conjunto de dados através desses perfis.

Figura 32 - Inspeção do cromatograma em 3D, com alinhamento coshif das amostras de hortaliças. **a)** e **a1)** tomate, **b)** e **b1)** pimentão, **c)** e **c1)** couve, **d)** e **d1)** alface, **e)** e **e1)** cenoura e **f)** e **f1)** beterraba. Os subitem 1 corresponde a amostra em outro ângulo. As setas vermelhas apontam para a falta ou quebra de informações em alguns comprimentos de onda após etapa de alinhamento das amostras.

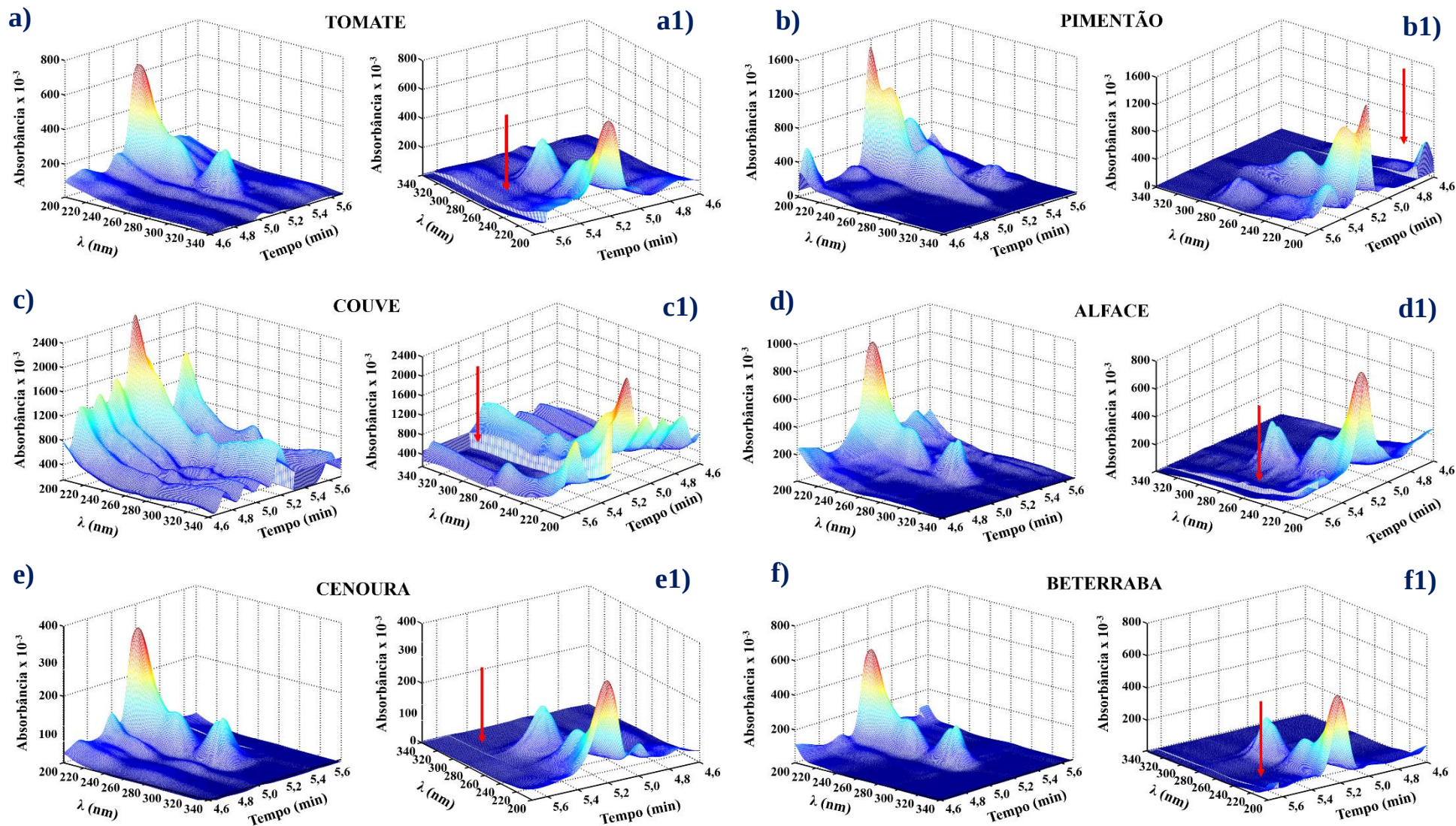
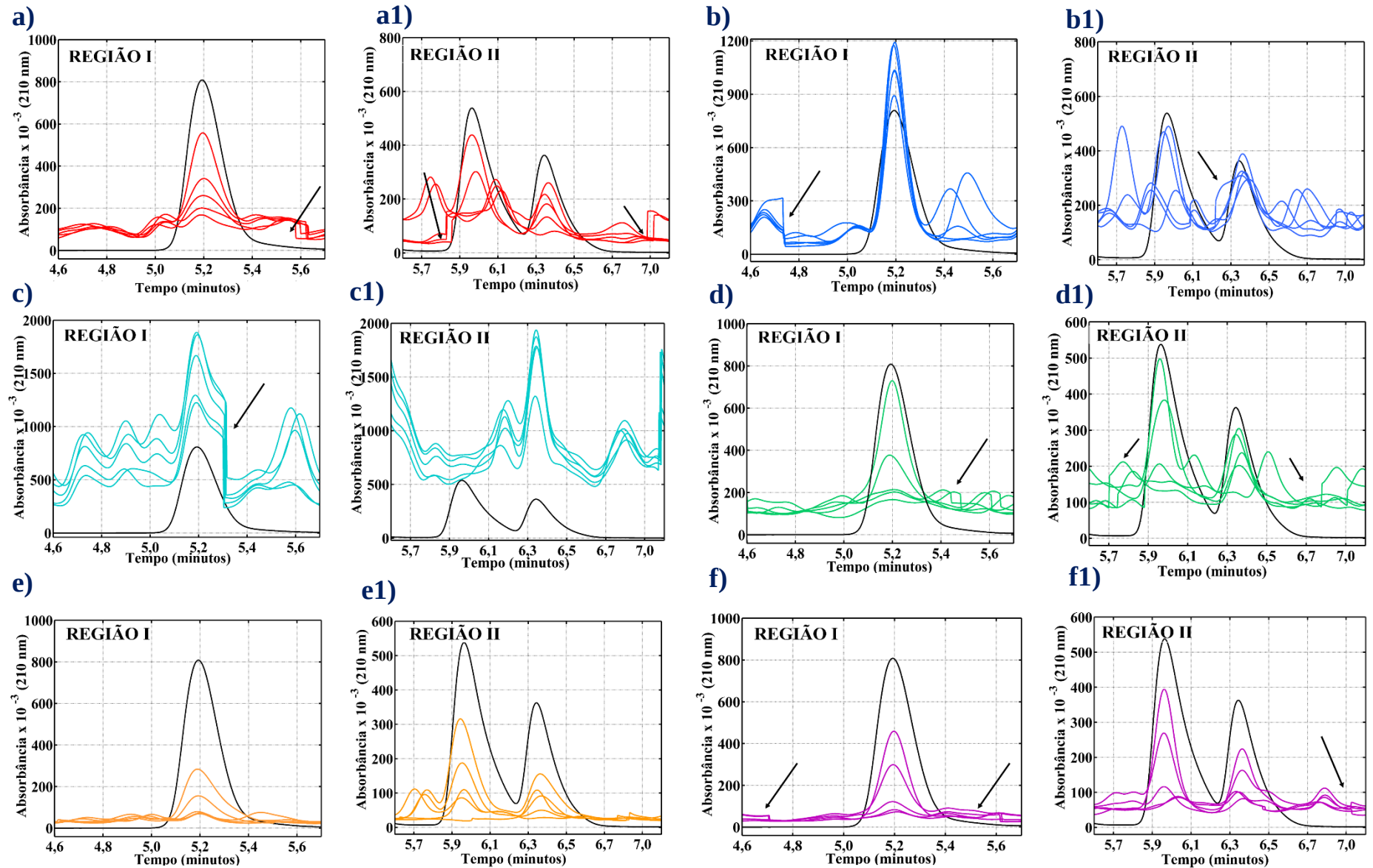


Figura 33 – Perfis de eluição cromatográficas, das regiões 1 (contém CBZ) (a - f) e região 2 (contém TBZ e FBZ), (a1 - f1) das seis amostras de hortaliças após alinhamento coshift: as cores das linhas variam de acordo com a amostra: **a)** tomate (—), **b)** pimentão (—), **c)** couve (—), **d)** alface (—), **e)** cenoura (—), **f)** beterraba (—). O perfil cromatográfico da amostra 7 do conjunto de calibração, em preto (—). As setas apontam para a falta ou quebra de informações nos tempos de retenção após etapa de alinhamento das amostras.



4.5.2 Quantificação de resíduos de pesticidas em hortaliças

Através dos diversos pré-processamentos existentes para a quantificação analítica em amostras reais, deve-se levar em consideração a que apresenta o melhor resultado.

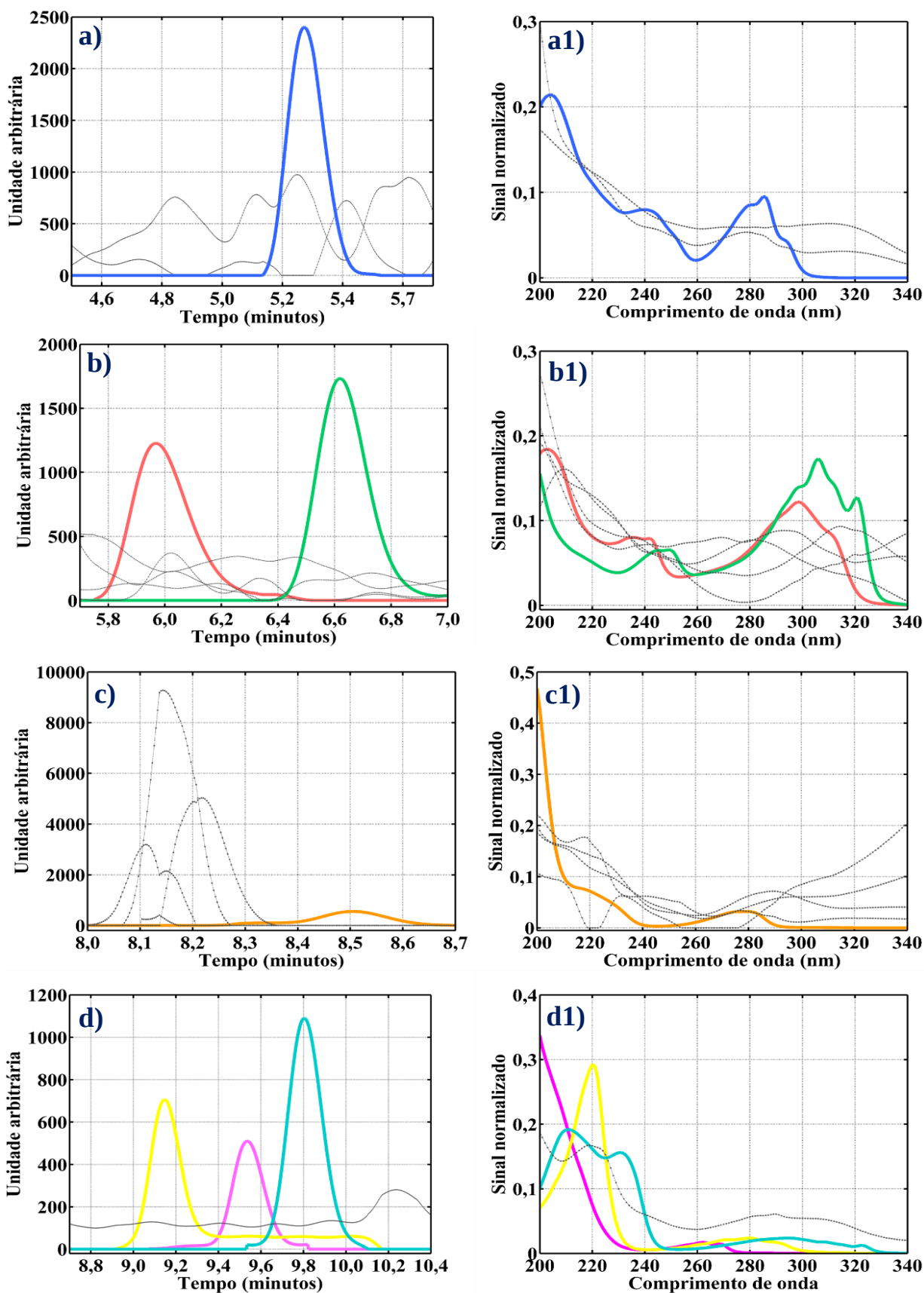
Como já discutido, o pré-processamento de extração dos analitos da amostra pode não ser suficiente para impedir coeluição entre os alvos ou interferentes. Isso dificulta e invalida a metodologia, quando a calibração univariada é utilizada para a quantificação desses resíduos, contudo, outras metodologias matemáticas poderiam contornar essas adversidades, como é o caso da calibração de segunda, terceira ou quarta ordem.

A subtração do branco ou limpeza quimiométrica foi uma outra estratégia para avaliar o desempenho das técnicas quimiométricas, considerando que a eluição gradiente embora consiga definir melhor a simetria dos picos, matematicamente poderia sobre ajustar o modelo matemático. Por fim, o alinhamento, que embora tenha trazido bons resultados na etapa de calibração, não foi tão eficiente para as amostras, apresentando deformações nos perfis recuperados pelo MCR – ALS.

Diante dessas possibilidades, os dados HPLC-DAD das amostras de hortaliças foram divididos em quatro regiões e submetidas aos mesmos procedimentos das amostras da etapa de calibração. Como antes, as seguintes restrições foram aplicadas: (a) a não-negatividade para todos os constituintes no tempo e nos perfis espectrais; (b) a unimodalidade foi aplicada apenas ao perfil de tempo que corresponde ao analito; e (c) a correspondência entre as espécies foi usado para informar que não há constituinte inesperado no conjunto de calibração. Todas essas três restrições e a divisão entre regiões ajudarão a garantir que não haja ambiguidade rotacional.

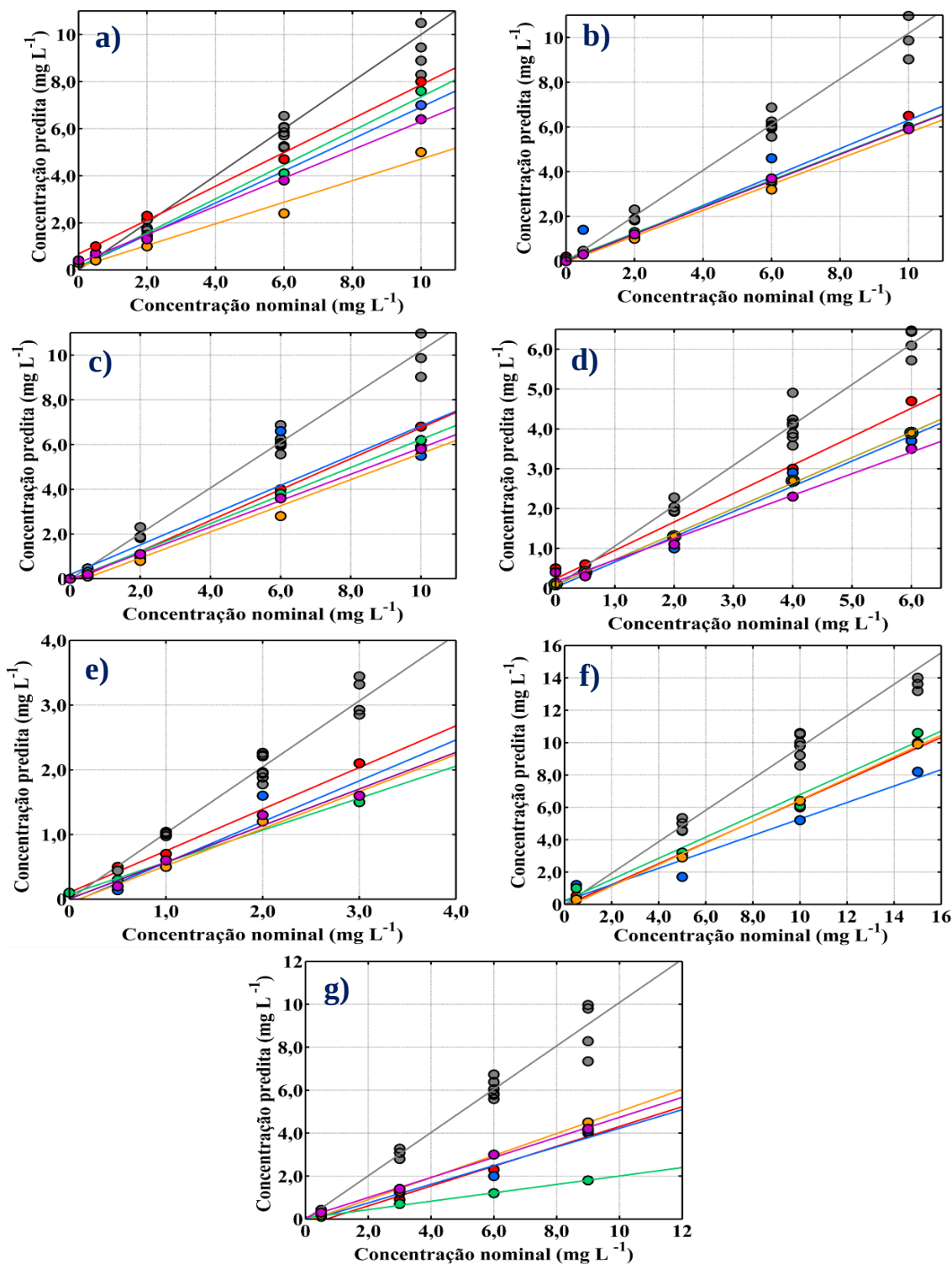
Na **Figura 34** é apresentado os perfis cromatográficos (eluição) e espectrais recuperados pelo MCR – ALS no quarto nível de concentração da adição de padrão, para amostra de tomate. As quatro regiões mostram que os perfis dos analitos são representados por linhas sólidas coloridas e interferências (linha pontilhada cinza). No **Apêndice A** serão apresentados os perfis das demais amostras de hortaliças trabalhadas.

Figura 34 - Perfis cromatográficos recuperados por MCR-ALS para o nível quatro da adição de padrão para amostra de **TOMATE**. **a)** Região I (CBZ), **b)** Região II (TBZ e FBZ), **c)** Região III (CBF) e **d)** Região IV (CBR, FLT e NFT). CBZ (—), TBZ (—), FBZ (—), CBF (—), CBR (—), FLT (—), NFT (—). De **a1-d1** os perfis espectrais recuperados. Em cinza (—) são os interferentes e seus respectivos perfis espectrais.



Para avaliar a presença do efeito de matriz foi realizado adição de padrão, como discutido na Seção 3.4. A Figura 35 apresenta as curvas das concentrações preditas versus nominais para todos os pesticidas e amostras de hortaliças analisadas.

Figura 35 - Avaliação do efeito de matriz através da comparação entre as inclinações das amostras de teste e amostras de hortaliças para cada analito: **a)** CBZ, **b)** TBZ, **c)** FBZ, **d)** CBF, **e)** CBR, **f)** FLT e **g)** NFT em teste (●), tomate (●), pimentão (●), alface (●), cenoura (●) e beterraba (●).



O efeito de matriz é um estudo que possibilita avaliar a seletividade causada pela presença de possíveis interferências provenientes de uma amostra. Assim é possível avaliar o paralelismo entre as curvas com os sinais dos padrões e as amostras fortificadas. Este fenômeno acarreta na diminuição ou ampliação do sinal instrumental ou resposta instrumental. Dessa forma, são realizados testes estatísticos como F e t para observar os desvios que essas concentrações podem sofrer na interação com as amostras e o processo de extração. Os resultados mostram que o efeito de matriz é considerado não significativo nas comparações das médias entre as concentrações das amostras e as dos conjuntos de calibração para cada analito. Esses dados estão apresentados na **Tabela 1A (Apêndice B)**.

Diante disso, observou-se diferenças apenas no coeficiente angular nas duas curvas analíticas, ou seja, amostras de teste e as amostras de hortaliças, o que significa que os componentes da matriz introduzem um erro sistemático proporcional, indicando o efeito da matriz em todas as amostras. Entretanto isso não impede a quantificação, apenas as recuperações são afetadas.

Para a amostra de couve não foi possível realizar a comparação do paralelismo entre as curvas, devido à grande quantidade de interferentes, contribuindo no sinal dos analitos, como visto na **Figura 31c**, principalmente no início da análise cromatográfica, onde é possível encontrar uma grande quantidade de co-extrativos de baixa retenção.

A intensidade do efeito de matriz é influenciada principalmente pela natureza da amostra e pelo tipo de co-extrativos, que variam desde a polaridade, o tamanho de partículas, a solubilidade, entre outros parâmetros que podem estar associados também à instrumentação utilizada.

Para realizar uma quantificação precisa dos resíduos de pesticidas nessas hortaliças, foi medida a área sob o perfil no modo de eluição (temporal) e correlacionada com as concentrações escolhidas da adição padrão. Assim, as concentrações previstas foram estimadas de forma semelhante ao método de adição padrão univariado. A **Tabela 12** mostra a concentração estimada pela calibração pseudounivariada: sem adição de padrão, nível zero, e pelo método de adição padrão, considerando o fator de pré-concentração, apresentado na **Tabela 4, Seção 3.4**.

Tabela 12 - Quantificação dos resíduos de pesticidas em amostras de hortaliças usando MCR - ALS e método de adição de padrão

	CBZ		TBZ		FBZ		CBF		CBR		FLT		NFT	
	N	P ^a	N	P ^a	N	P ^a	N	P ^a	N	P ^a	N	P ^a	N	P ^a
Tomate	0,0	< LOQ	0,0	0,2	0,0	< LOQ	0,0	0,5	0,0	< LOQ	0,0	< LOQ	0,0	< LOQ
	0,5	1,6	0,5	0,30	0,5	0,30	0,5	0,50	0,5	0,50	0,5	0,50	0,5	0,1
	2,0	2,3	2,0	1,0	2,0	0,9	2,0	1,3	1,0	0,3	5,0	3,0	3,0	0,9
	6,0	4,7	6,0	3,5	6,0	4,0	4,0	3,0	2,0	1,3	10	6,0	6,0	2,3
	10,0	8,0	10,0	6,5	10,0	6,8	6,0	4,7	3,0	1,7	15	10	9,0	4,0
Inicial ^b		< LOQ		0,02		< LOQ		0,02		< LOQ		< LOQ		< LOQ
Pimentão	0,0	0,3	0,0	< LOQ	0,0	< LOQ	0,0	0,14	0,0	< LOQ	0,0	< LOQ	0,0	< LOQ
	0,5	0,4	0,5	1,4	0,5	0,13	0,5	0,3	0,5	0,14	0,5	1,2	0,5	0,26
	2,0	1,4	2,0	1,1	2,0	1,0	2,0	1,0	1,0	0,5	5,0	1,7	3,0	1,2
	6,0	4,1	6,0	4,6	6,0	6,6	4,0	2,9	2,0	1,6	10	5,2	6,0	2,0
	10,0	7,0	10,0	6,0	10,0	5,5	6,0	3,7	3,0	1,6	15	8,2	9,0	4,1
Inicial ^b		0,03		< LOQ		< LOQ		0,014		< LOQ		< LOQ		< LOQ
Alface	0,0	0,3	0,0	0,1	0,0	< LOQ	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	< LOQ	0,0	< LOQ
	0,5	0,6	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5	0,4	0,5	0,3	0,5	1,0	0,5	0,1
	2,0	1,4	2,0	1,3	2,0	1,1	2,0	1,3	1,0	0,5	5,0	3,2	3,0	0,7
	6,0	4,1	6,0	3,6	6,0	3,8	4,0	2,7	2,0	1,2	10	6,1	6,0	1,2

CONTINUAÇÃO DA TABELA

	CBZ		TBZ		FBZ		CBF		CBR		FLT		NFT	
	N	P ^a	N	P ^a	N	P ^a	N	P ^a	N	P ^a	N	P ^a	N	P ^a
	10,0	7,6	10,0	6,0	10,0	6,2	6,0	3,9	3,0	1,5	15	10,6	9,0	1,8
Inicial ^b		0,04		0,04		< LOQ		0,08		0,02		< LOQ		< LOQ
Cenoura	0,0	0,3	0,0	0,1	0,0	< LOQ	0,0	0,7	0,0	< LOQ	0,0	< LOQ	0,0	< LOQ
	0,5	0,4	0,5	0,3	0,5	0,1	0,5	0,6	0,5	0,2	0,5	0,3	0,5	0,2
	2,0	1,0	2,0	1,0	2,0	0,8	2,0	1,2	1,0	0,5	5,0	2,9	3,0	1,3
	6,0	2,4	6,0	3,2	6,0	2,8	4,0	2,2	2,0	1,2	10	6,4	6,0	3,0
	10,0	5,0	10,0	5,9	10,0	5,9	6,0	3,6	3,0	1,6	15	9,9	9,0	4,5
Inicial ^b		0,06		0,02		< LOQ		0,02		< LOQ		< LOQ		< LOQ
Beterraba	0,0	0,4	0,0	< LOQ	0,0	< LOQ	0,0	0,4	0,0	< LOQ	0,0	0,3	0,0	< LOQ
	0,5	0,7	0,5	0,3	0,5	0,2	0,5	0,3	0,5	0,2	0,5	0,6	0,5	0,3
	2,0	1,3	2,0	1,2	2,0	1,1	2,0	1,1	1,0	0,6	5,0	3,4	3,0	1,4
	6,0	3,8	6,0	3,7	6,0	3,6	4,0	2,3	2,0	1,3	10	6,6	6,0	3,0
	10,0	6,4	10,0	5,9	10,0	5,8	6,0	3,5	3,0	1,6	15	9,7	9,0	4,2
Inicial ^a		0,07		< LOQ		< LOQ		< LOQ		< LOQ		0,07		< LOQ

^a Concentração predita em mg Kg⁻¹ para amostras de hortaliças, utilizando a massa de cada nível e amostras utilizadas, segundo o modelo MCR-ALS, ^b Concentração inicial para as amostras sem adição de padrão. Para o cálculo da concentração em mg kg⁻¹, levando em consideração a massa de cada amostra pesada, utilizou a seguinte expressão:

$$C(mg L^{-1}) \times \frac{\text{Volume de solvente (L)}}{\text{Massa da amostra (kg)}}$$

Atualmente o país vem sofrendo constantes alterações com relação à autorização desses agrotóxicos em diversas culturas. Como discutido anteriormente, o crescimento populacional requer o aumento do cultivo de alimentos e consequentemente um aumento na utilização desses pesticidas, contudo, é necessário que haja estudos e controle que assegure a confiabilidade desses alimentos. No Brasil, um dos principais órgãos é a ANVISA, além do MAPA e IBAMA, que juntos buscam monitorar e legislar sobre a utilização desses insumos.

Dos sete resíduos de pesticidas estudados, cinco foram encontrados nas análises dessas hortaliças, isso pode se tornar preocupante pelo fato de acarretar no acúmulo dessas substâncias em nosso organismo, diante do consumo diário que fazemos desses produtos naturais.

Desde o início deste estudo, muitas alterações foram encontradas com relação aos limites máximos de resíduos permitidos (LMR), e a autorização de alguns desses resíduos de pesticidas no país. Recentemente foi lançada uma plataforma que permite acompanhar todas as informações gerais das monografias de cada agrotóxico, com resolução vigente no país (ANVISA, 2019).

De acordo com dados expostos **Tabela 1, seção 2.1.1**, a ANVISA permite a aplicação do carbendazim (CBZ) apenas nas culturas de algodão, citros, feijão, maçã, milho, soja e trigo. No presente estudo foi encontrado o carbendazim no cultivo do pimentão, cenoura e beterraba. Isso mostra a utilização incorreta deste agrotóxico diante às agências de fiscalização do país, contudo para o *Codex Alimentarius*, agência internacional, há essa permissão que está dentro do limite permitido.

É importante salientar que em janeiro de 2020, através do Edital de Chamamento Público 01/2019, a ANVISA convocou as empresas detentoras de registro de agrotóxicos à base de carbendazim para uma reunião sobre os procedimentos de reavaliação toxicológicas. Esse procedimento tem como objetivo definir novos critérios de risco à saúde humana, em especial dos consumidores e trabalhadores rurais (ANVISA, 2019).

Para o uso do agrotóxico tiabendazol (TBZ), há a autorização em inúmeras culturas, dentre elas as culturas de tomate, pimentão, alface e cenoura, contudo, as concentrações encontradas foram superiores aos limites permitidos, que pode causar danos ao organismo, já que a autorização de determinada concentração é feita com base na exposição dietética e ingestão diária desses insumos.

Motivado por outros países, como Canadá, Estados Unidos e Europa, realizou-se no Brasil uma reavaliação na utilização do agrotóxico carbofuran (CBF), e desde 2018 sua utilização está proibida neste país. Segundo os estudos, o produto tem potencial de causar toxicidade para o desenvolvimento de seres humanos, danos físicos e comportamentais ao feto

durante à gravidez (ANVISA, 2018). Segundo este estudo, através da quantificação utilizando o MCR-ALS, foi possível encontrar esse agrotóxico nas culturas de tomate, pimentão, alface e cenoura.

Para o flutriafol (FLT), foi possível quantificá-lo apenas na cultura de beterraba, com 0,07 mg kg⁻¹, estando dentro dos limites estabelecidos pela agência regulamentadora.

O 1 - naftol (NFT) é apenas um produto de degradação do carbaril (CBR), que ao ser exposto às temperaturas superiores a 38°C, pode transformar-se neste outro agrotóxico. Como vivemos em uma região de clima litorâneo ao semiárido pode acontecer facilmente essa degradação. Mesmo diante dessa condição, não foi possível quantificar esse resíduo de agrotóxico em nenhuma das amostras estudadas.

4.6 Avaliação da metodologia proposta frente a outras metodologias encontradas na literatura

A metodologia proposta tem como objetivos principais utilizar uma eluição gradiente e o MCR-ALS. A primeira é utilizada para conseguir contornar problemas na retenção dos analitos, tendo em vista que os analitos possuem características e estruturas diferentes; e a segunda proposta é conseguir quantificar a presença de interferentes em amostras complexas. Isso mostra a capacidade de exatidão da metodologia, o que reduz o tempo de análise e a confiabilidade dessa quantificação.

A grande maioria dos estudos com MCR-ALS utilizam eluição isocrática, método em que a proporção de solvente é constante durante a corrida cromatográfica, podendo reduzir o tempo de análise, mas comprometer a simetria e a retenção dos analitos na coluna.

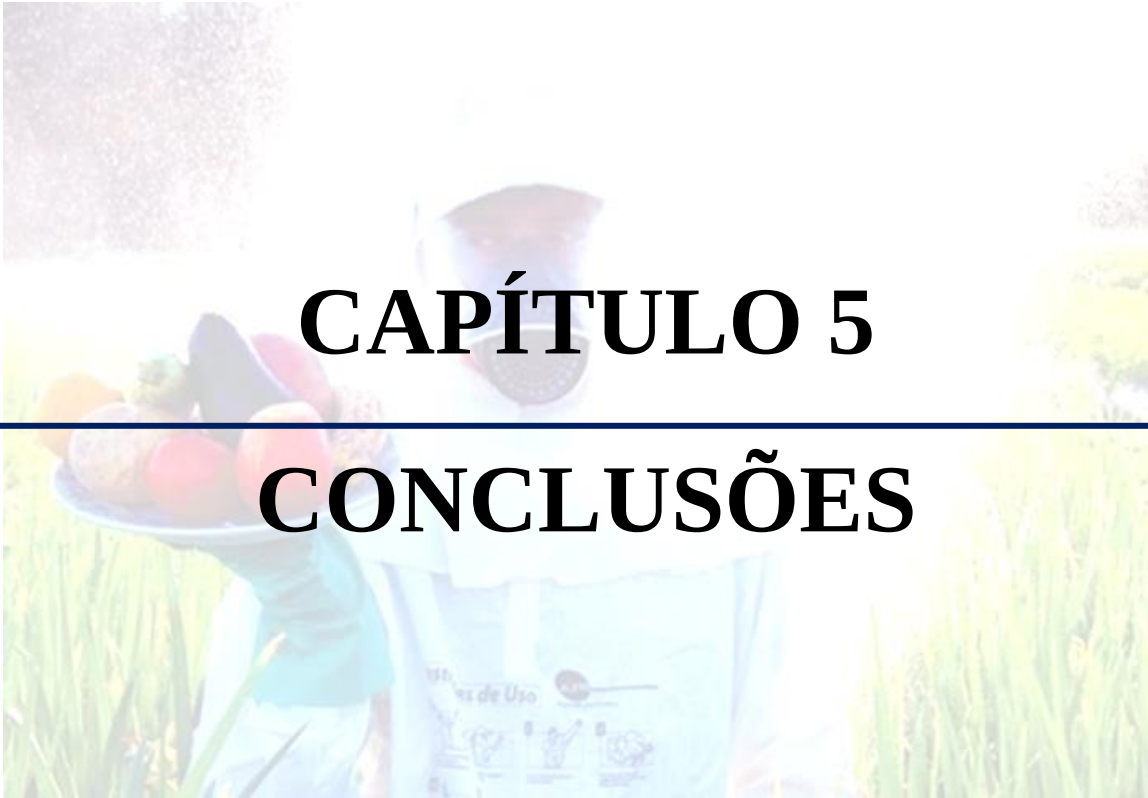
Tendo em vista o desenvolvimento da metodologia, por meio da utilização dessas estratégias, foi realizada uma comparação com outros trabalhos recentes, encontrados na literatura, que utilizam cromatografia em fase líquida com eluição isocrática ou gradiente para análises de resíduos de pesticidas em frutas e hortaliças, apresentado na **Tabela 12**.

Além desses trabalhos, que relatam apenas os analitos de interesse desta tese, bem como o tipo de amostra utilizada, existem uma grande variedade de trabalhos com pesticidas, que utilizam HPLC – DAD, principalmente em análise de água residuais, rios, alimentos processados, como sucos, ou com a utilização de outros detectores com maior sensibilidade e seletividade, ou preparo de amostras cada vez mais seletivas (Nasiri, Ahmadzadeh, e Amiri, 2020; Pérez-Outeiral et al., 2017; Scheel e Teixeira Tarley, 2019; Silva, Gonzaga, Fett, e Oliveira Costa, 2019).

Tabela 13 - Metodologias cromatográficas relatadas para quantificação de resíduos de pesticidas em hortaliças e frutas.

AMOSTRA	Extração ^a	Analitos ^b	Método analítico ^c	Tratamento dos dados	Tempo de eluição ^d	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Referência
Suco de tomate	G-MNPs	CBF (5)	HPLC-DAD	Univariado	17 min (EG)	-	(Li et al., 2015)
Tomate e suco processado	Diluição em metanol	FBZ, TBZ, CBZ, CBR (5)	HPLC- DAD	Multivariado	9,5 min (EI) água/metanol	0,32 – 12	(Boeris et al., 2014)
Água e hortaliças	SPE-MIP	CBZ	HPLC - DAD	Univariado	8 min (EI)	23	(Akkbik e Hazer, 2018)
Hortaliças	PMME	CBR (3)	HPLC - DAD	Univariado	12 min (EI) água/metanol	0,36 – 2,6	(H. Ma, Feng, Tian, e Jia, 2013)
Frutas	G-HF-LPME	CBR (3)	HPLC - DAD	Univariado	40 min (EI) água/metanol	0,2 – 1,0	(X. Ma, Wang, Wu, Wang, e Wang, 2014)
Suco de laranja	DLLME	CBZ, TBZ, FBZ, CBF, CBR, NFT (7)	HPLC-FLD	Multivariado	5 min (EI)	0,4 - 100	(Montemurro et al., 2016)
Suco de laranja	Diluição em metanol	CBZ, TBZ, FBZ, CBR (5)	HPLC - DAD	Multivariado	9,5 min (EI)	-	(Santiago A. Bortolato e Olivieri, 2014)
Hortaliças	QuEChERS	CBZ, TBZ, FBZ, CBF, CBR, FLT, NFT	HPLC-DAD	Univariado/ Multivariado	26 min (EG) água/metanol	4 - 11	(Sousa, Schneider, Pinto, de Araujo, e de Araújo Gomes, 2020)
Hortaliças	QuEChERS	CBZ, TBZ, FBZ, CBF, CBR, FLT, NFT	HPLC-DAD	Multivariado	15 min (EG) Água/acetoneitrila	0,79 – 58,8	Este trabalho

^a G-MNPs (Magnetic graphene solid-phase extraction), PMME (polymer monolith microextraction), G-HF-LPME (graphene reinforced hollow fibre liquid phase microextraction method), ZIF-8 (zeolitic imidazolate framework-8); ^b Número de constituintes analisados em parênteses; ^c HPLC (High Performance Liquid Chromatography), DAD (Diode Array Detector), FLD (Fluorescence Detector); ^d EG (Eluição gradiente), EI (Eluição isocrática).

A person wearing a white lab coat and a white face mask is holding a plate of various fruits, including apples, oranges, and bananas. They are standing in a field of tall green grass. The image is slightly faded and serves as a background for the chapter title.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES FINAIS

Com base no desenvolvimento de estudo teórico e experimental realizados e nos resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que:

A metodologia desenvolvida para a quantificação de multirresíduos de pesticidas em amostras de hortaliças utilizando a técnica de Cromatografia Líquida acoplada ao Detector de Arranjo de Diodos (HPLC – DAD) apresentou ser rápida (tendo em vista a utilização de uma eluição gradiente), simples e de baixo custo, empregando um preparo de amostras com extração QuEChERS.

Para contornar a utilização da eluição gradiente, que apresenta uma linha de base capaz de interferir na estimativa do posto da matriz de dados da calibração multivariada, foi realizada uma “limpeza quimiométrica” com a subtração do branco de todas as amostras. Esta estratégia apresentou ser uma boa alternativa para o tratamento dos dados de segunda ordem.

Avaliou-se o desempenho de três processamentos de alinhamento antes da utilização das técnicas quimiométricas de calibração multivariada, o COW, *icoshift* e *coshift*, sendo este último o de melhor desempenho para as amostras de calibração, contudo, no alinhamento das amostras não foi satisfatório.

Foram analisados os desempenhos dos modelos UPLS-RBL e MCR-ALS nas amostras de calibração para a predição de CBZ, TBZ, FBZ, CBF, CBR, FLT e NFT, usando dados de segunda ordem gerados por HPLC-DAD. As métricas de desempenho analítico apontam que o MCR-ALS atinge resultados satisfatórios com REP inferior à 10% para todos os analitos, sendo capaz de prever concentrações abaixo das curvas de calibração de cada constituinte, mostrando-se uma ferramenta sensível, seletiva e confiável para a quantificação das amostras futuras de hortaliças.

Os limites de quantificação dos princípios ativos estudados, empregando a técnica de MCR-ALS, atendem os limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos por órgãos de normalização, principalmente a legislação brasileira vigente (ANVISA).

Os níveis de resíduos de pesticidas encontrados nas amostras de tomate, pimentão, couve, alface, cenoura e beterraba, representam um alerta, tendo em vista a descontinuidade da utilização de agrotóxicos devido aos riscos à saúde, como exemplo, podemos citar o carbofuran, recentemente banido do país; e o carbendazim, que passa por estudos complexos de toxicidade.

A metodologia desenvolvida e as estratégias utilizadas podem auxiliar em estudos de multirresíduos de pesticidas em matrizes mais complexas, considerando a obtenção da vantagem de segunda ordem adquirida por calibração multivias. Esse trabalho contribui para

auxiliar nos estudos em laboratórios que não possuem técnicas mais avançadas, como a Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (LC – MS), mostrando que medidas alternativas também são eficazes na quantificação e monitoramento desses resíduos de pesticidas.

Além de todas as conclusões supramencionadas é de extrema importância alertar a população para a segurança alimentar, e cobrar de instituições governamentais todas as informações de pesquisas, uso e monitoramento dos resíduos de pesticidas.

REFERÊNCIAS

- Ahmadvand, M., Parastar, H., Sereshti, H., Olivieri, A., e Tauler, R. (2017). A systematic study on the effect of noise and shift on multivariate figures of merit of second-order calibration algorithms. *Analytica Chimica Acta*, 952, 18–31. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.11.070>
- Akkbik, M., e Hazer, O. (2018). Novel molecularly imprinted polymer for the determination of carbendazim from water and food by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Analytical Letters*, 51(1–2), 7–23. <https://doi.org/10.1080/00032719.2017.1284859>
- Alcântara, D. B., Fernandes, T. S. M., Nascimento, H. O., Lopes, A. F., Menezes, M. G. G., Lima, A. C. A., Nascimento, R. F. (2019). Diagnostic detection systems and QuEChERS methods for multiclass pesticide analyses in different types of fruits: An overview from the last decade. *Food Chemistry*, 298, 124958. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.124958>
- Alcaráz, M. R., Siano, G. G., Culzoni, M. J., de la Peña, A. M., e Goicoechea, H. C. (2014). Modeling four and three-way fast high-performance liquid chromatography with fluorescence detection data for quantitation of fluoroquinolones in water samples. *Analytica Chimica Acta*, 809, 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.12.011>
- Alfarhani, B., Al-Tameemi, M., Goicoechea, H. C., Barbosa, F., e Campiglia, A. D. (2018). Direct analysis of benzo[a]pyrene metabolites with strong overlapping in both the spectral and lifetime domains. *Microchemical Journal*, 137, 51–61. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.09.022>
- Allegrini, F., e Olivieri, A. C. (2014). IUPAC-consistent approach to the limit of detection in partial least-squares calibration. *Analytical Chemistry*, 86(15), 7858–7866. <https://doi.org/10.1021/ac501786u>
- Allegrini, F., e Olivieri, A. C. (2018). Figures of Merit. In *Opto-structural Analysis* (2^o ed). <https://doi.org/10.1117/3.2317988.ch8>
- ANVISA (2018). Notícias. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/termina-prazo-de-descontinuacao-do-uso-de-carbofurano/219201. Acesso em 10/01/2020.
- ANVISA (2019). Painel de Monografias de Agrotóxicos. Disponível em: <https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoiNTU0Y2ZhYmItYjM1MC00ODgyLTlhYmItMzFkMjI1YWU4MGNkIiwidCI6ImI2N2FmMjNmLWMzZjMtNGQzNS04MGM3LWI3MDg1ZjVlZGQ4MSJ9>. Acesso em 10/01/2020.
- Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Štajnbaher, D., e Schenck, F. J. (2003). Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *Journal of AOAC International*, 86(2), 412–431.
- Arancibia, J. A., Damiani, P. C., Escandar, G. M., Ibañez, G. A., e Olivieri, A. C. (2012). A review on second- and third-order multivariate calibration applied to chromatographic data.

- Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 910, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.02.004>
- Bauza, M. C., Ibañez, G. A., Tauler, R., e Olivieri, A. C. (2012). Sensitivity equation for quantitative analysis with multivariate curve resolution-alternating least-squares: Theoretical and experimental approach. *Analytical Chemistry*, 84(20), 8697–8706. <https://doi.org/10.1021/ac3019284>
- Bloemberg, T. G., Gerretzen, J., Lunshof, A., Wehrens, R., e Buydens, L. M. C. (2013). Warping methods for spectroscopic and chromatographic signal alignment: A tutorial. *Analytica Chimica Acta*, 781, 14–32. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.03.048>
- Boeris, V., Arancibia, J. A., e Olivieri, A. C. (2014). Determination of five pesticides in juice, fruit and vegetable samples by means of liquid chromatography combined with multivariate curve resolution. *Analytica Chimica Acta*, 814, 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.01.034>
- Bortolato, S. A., Arancibia, J. A., Escandar, G. M., e Olivieri, A. C. (2010). Time-alignment of bidimensional chromatograms in the presence of uncalibrated interferences using parallel factor analysis. Application to multi-component determinations using liquid-chromatography with spectrofluorimetric detection. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 101(1), 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2009.12.001>
- Bortolato, Santiago A., e Olivieri, A. C. (2014). Chemometric processing of second-order liquid chromatographic data with UV-vis and fluorescence detection. A comparison of multivariate curve resolution and parallel factor analysis 2. *Analytica Chimica Acta*, 842, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.07.007>
- BRASIL (2002). DECRETO Nº 4.074, DE 4 DE JANEIRO DE 2002. Disponível em : http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm. Acesso em 10/01/2020
- BRASIL (2014). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. Indicadores de Desenvolvimento Sustentável. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/ids/tabelas>. Acesso em 10/01/2020.
- BRASIL (2018). Ministério da Saúde/AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA/DIRETORIA COLEGIADA. RESOLUÇÃO Nº 185, DE 18 DE OUTUBRO DE 2017. Disponível em: http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19362345/do1-2017-10-19-resolucao-n-185-de-18-de-outubro-de-2017-19362255
- BRASIL (2019). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Insumos agropecuários. Insumos agrícolas. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/informacoes-tecnicas>. Acesso em: 07/01/2020.
- Campos, É., e Freire, C. (2016). Exposure to non-persistent pesticides and thyroid function: A systematic review of epidemiological evidence. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 219(6), 481–497. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2016.05.006>
- Codex Alimentarius. *Codex Alimentarius*. Codex Pesticides Residues in Food Online Database. Codex Alimentarius Commission up to and including its 42nd Session (July 2019).

Disponível em: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/en/>. Acesso em: 07/01/2020.

Daniel C, Harris e Charles A, Lucy, *Análise Química Quantitativa* - 9ª Ed, 2017

de la Peña, A. ., Goicoechea, H. C., Escandar, G. M., e Olivieri, A. C. (2015). Fundamentals and Analytical Applications of Multiway Calibration. In *Data Handling in Science and Technology* (Vol. 29). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63527-3.00005-9>

Dimpe, K. M., e Nomngongo, P. N. (2016a). Current sample preparation methodologies for analysis of emerging pollutants in different environmental matrices. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 82, 199–207. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.05.023>

Dimpe, K. M., e Nomngongo, P. N. (2016b). Current sample preparation methodologies for analysis of emerging pollutants in different environmental matrices. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 82, 199–207. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.05.023>

EPA – United States Environmental Protection Agency. Disponível em: <https://www.epa.gov/ccf>. Acesso em 10/01/2020.

Escandar, G. M., Goicoechea, H. C., Muñoz de la Peña, A., e Olivieri, A. C. (2014). Second- and higher-order data generation and calibration: A tutorial. *Analytica Chimica Acta*, 806, 8–26. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.11.009>

Escandar, G. M., Olivieri, A. C., Faber, N. (Klaas) M., Goicoechea, H. C., Muñoz de la Peña, A., e Poppi, R. J. (2007). Second- and third-order multivariate calibration: data, algorithms and applications. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 26(7), 752–765. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.04.006>

Farajzadeh, M. A., Yadeghari, A., e Khoshmaram, L. (2017). Combination of dispersive solid phase extraction and dispersive liquid–liquid microextraction for extraction of some aryloxy pesticides prior to their determination by gas chromatography. *Microchemical Journal*, 131, 182–191. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.12.013>

Geissen, V., Mol, H., Klumpp, E., Umlauf, G., Nadal, M., van der Ploeg, M., Ritsema, C. J. (2015). Emerging pollutants in the environment: A challenge for water resource management. *International Soil and Water Conservation Research*, 3(1), 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.iswcr.2015.03.002>

González-Curbelo, M., Socas-Rodríguez, B., Herrera-Herrera, A. V., González-Sálamo, J., Hernández-Borges, J., e Rodríguez-Delgado, M. (2015). Evolution and applications of the QuEChERS method. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 71, 169–185. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.012>

H. Musarurwa, L. Chimuka, V. E Pakade, N. T. T. (2019). Recent developments and applications of QuEChERS based techniques on food samples during pesticide analysis. *Journal of Food Composition and Analysis*, 106012. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103314>

Hermes, N., Jewell, K. S., Wick, A., e Ternes, T. A. (2018). Quantification of more than 150 micropollutants including transformation products in aqueous samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using scheduled multiple reaction monitoring.

- Journal of Chromatography A*, 1531, 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.11.020>
- Hernández, A. F., Parrón, T., Tsatsakis, A. M., Requena, M., Alarcón, R., e López-Guarnido, O. (2013). Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level: Their relevance to human health. *Toxicology*, 307, 136–145. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.06.009>
- Jalalvand, A. R., Goicoechea, H. C., e Rutledge, D. N. (2017). Applications and challenges of multi-way calibration in electrochemical analysis. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 87, 32–48. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.11.002>
- Jaumot, J., de Juan, A., e Tauler, R. (2015). MCR-ALS GUI 2.0: New features and applications. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 140, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2014.10.003>
- Juan, A. de, Jaumot, J., e Tauler, R. (2015). Multivariate Curve Resolution (MCR). Solving the mixture analysis problem. *Analytical Methods*, 00, 1–6. <https://doi.org/10.1039/C5AY01058F>
- Komsta, Ł., Heyden, V. Y., e Joseph, S. (2018). *Chemometrics in chromatography* (Taylor e F). Boca Raton.
- Konatu, F., Breitzkreitz, M. C., e Jardim, I. C. (2017). Revisiting quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe parameters for sample preparation in pesticide residue analysis of lettuce by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1482, 11–22. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.12.061>
- Kościelniak, P., e Wieczorek, M. (2016). Univariate analytical calibration methods and procedures. A review. *Analytica Chimica Acta*, 944, 14–28. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.09.024>
- Lehotay, S. J., De Kok, A., Hiemstra, M., e Van Bodegraven, P. (2005). Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection. *Journal of AOAC International*, 88(2), 595–614.
- Li, N., Chen, J., e Shi, Y. P. (2015). Magnetic graphene solid-phase extraction for the determination of carbamate pesticides in tomatoes coupled with high performance liquid chromatography. *Talanta*, 141, 212–219. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.04.018>
- Liu, Z., Qi, P., Wang, X., Wang, Z., Xu, X., Chen, W., ... Wang, X. (2017). Multi-pesticides residue analysis of grains using modified magnetic nanoparticle adsorbent for facile and efficient cleanup. *Food Chemistry*, 230, 423–431. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.082>
- Ma, H., Feng, W., Tian, M., e Jia, Q. (2013). Determination of N-methylcarbamate pesticides in vegetables by poly(methacrylic acid-co-ethylene glycol dimethacrylate) monolith microextraction coupled with high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 929, 27–32. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.01.036>
- Ma, X., Wang, J., Wu, Q., Wang, C., e Wang, Z. (2014). Extraction of carbamate pesticides in fruit samples by graphene reinforced hollow fibre liquid microextraction followed by high

- performance liquid chromatographic detection. *Food Chemistry*, 157, 119–124. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.007>
- Maggio, R. M., Damiani, P. C., e Olivieri, A. C. (2011). Multivariate curve-resolution analysis of pesticides in water samples from liquid chromatographic-diode array data. *Talanta*, 83(4), 1173–1180. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.06.059>
- Magi, E., Di Carro, M., Mirasole, C., e Benedetti, B. (2018). Combining passive sampling and tandem mass spectrometry for the determination of pharmaceuticals and other emerging pollutants in drinking water. *Microchemical Journal*, 136, 56–60. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.10.029>
- Mansour, F. R., e Danielson, N. D. (2018). Solvent-terminated dispersive liquid-liquid microextraction: a tutorial. *Analytica Chimica Acta*, 1016, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.02.005>
- Março, P. H., Valderrama, P., Alexandrino, G. L., Poppi, R. J., e Tauler, R. (2014). Resolução Multivariada De Curvas Com Mínimos Quadrados Alternantes: Descrição, Funcionamento E Aplicações. *Química Nova*, 1–8.
- Mas, S., de Juan, A., Tauler, R., Olivieri, A. C., e Escandar, G. M. (2010). Application of chemometric methods to environmental analysis of organic pollutants: A review. *Talanta*, 80(3), 1052–1067. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.09.044>
- Masiá, A., Blasco, C., e Picó, Y. (2014). Last trends in pesticide residue determination by liquid chromatography-mass spectrometry. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 2(2455), 11–24. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2014.03.002>
- Megson, D., Reiner, E. J., Jobst, K. J., Dorman, F. L., Robson, M., e Focant, J. F. (2016). A review of the determination of persistent organic pollutants for environmental forensics investigations. *Analytica Chimica Acta*, 941, 10–25. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.08.027>
- Monago-Maraña, O., Guzmán-Becerra, M., Muñoz de la Peña, A., e Galeano-Díaz, T. (2018). Determination of pungency in spicy food by means of excitation-emission fluorescence coupled with second-order chemometric calibration. *Journal of Food Composition and Analysis*, 67(December 2017), 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.12.031>
- Montemurro, M., Pinto, L., Véras, G., De Araújo Gomes, A., Culzoni, M. J., Ugulino De Araújo, M. C., e Goicoechea, H. C. (2016). Highly sensitive quantitation of pesticides in fruit juice samples by modeling four-way data gathered with high-performance liquid chromatography with fluorescence excitation-emission detection. *Talanta*, 154, 208–218. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.03.078>
- Montemurro, M., Siano, G. G., Alcaráz, M. R., e Goicoechea, H. C. (2017). Third order chromatographic-excitation-emission fluorescence data: Advances, challenges and prospects in analytical applications. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 93, 119–133. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.05.011>
- Monzón, C. M., Teglia, C. M., Delfino, M. R., e Goicoechea, H. C. (2018). Multiway calibration strategy with chromatographic data exploiting the second-order advantage for quantitation of three antidiabetic and three antihypertensive drugs in serum samples.

- Microchemical Journal*, 136, 185–192. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.11.019>
- Moreira, E. D. T., Pinto, L., Gomes, A. A., Goicoechea, H. C., e Araújo, M. C. U. (2015). A fast chromatographic method for determination of daidzein and genistein in spiked water river samples using multivariate curve resolution. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 26(8), 1573–1582. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150125>
- Mortera, P., Zuljan, F. A., Magni, C., Bortolato, S. A., e Alarcón, S. H. (2018). Multivariate analysis of organic acids in fermented food from reversed-phase high-performance liquid chromatography data. *Talanta*, 178(July 2017), 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.09.005>
- Nasiri, M., Ahmadzadeh, H., e Amiri, A. (2020). Sample preparation and extraction methods for pesticides in aquatic environments: A review. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 123, 115772. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115772>
- Nielsen, N. P. V., Carstensen, J. M., e Smedsgaard, J. (1998). Aligning of single and multiple wavelength chromatographic profiles for chemometric data analysis using correlation optimised warping. *Journal of Chromatography A*, 805(1–2), 17–35. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00021-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00021-1)
- Ocaña-González, J. A., Villar-Navarro, M., Ramos-Payán, M., Fernández-Torres, R., e Bello-López, M. A. (2015). New developments in the extraction and determination of parabens in cosmetics and environmental samples. A review. *Analytica Chimica Acta*, 858(1), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.07.002>
- Oellig, C., e Schmid, S. (2019). Polyethyleneimine as weak anionic exchanger adsorbent for clean-up in pesticide residue analysis of fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1597, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.03.020>
- Olivieri, A. C. (2014). Analytical figures of merit: From univariate to multiway calibration. *Chemical Reviews*, 114(10), 5358–5378. <https://doi.org/10.1021/cr400455s>
- Olivieri, A. C., e Escandar, G. M. (2000). *Practical Three-Way Calibration*.
- Olivieri, A. C., Wu, H. L., e Yu, R. Q. (2009). MVC2: A MATLAB graphical interface toolbox for second-order multivariate calibration. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 96(2), 246–251. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2009.02.005>
- Parastar, H., e Akvan, N. (2014). Multivariate curve resolution based chromatographic peak alignment combined with parallel factor analysis to exploit second-order advantage in complex chromatographic measurements. *Analytica Chimica Acta*, 816, 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.01.051>
- Parrilla Vázquez, P., Ferrer, C., Martínez Bueno, M. J., e Fernández-Alba, A. R. (2019). Pesticide residues in spices and herbs: Sample preparation methods and determination by chromatographic techniques. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 115, 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.03.022>
- Pedrouzo, M., Borrull, F., Marcé, R. M., e Pocurull, E. (2011). Analytical methods for personal-care products in environmental waters. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 30(5), 749–760. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.01.009>

- Pellegrino Vidal, R. B., Allegrini, F., e Olivieri, A. C. (2017). The effect of constraints on the analytical figures of merit achieved by extended multivariate curve resolution-alternating least-squares. *Analytica Chimica Acta*, 1003, 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.12.008>
- Perestrelo, R., Silva, P., Porto-Figueira, P., Pereira, J. A. M., Silva, C., Medina, S., e Câmara, J. S. (2019). QuEChERS - Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends. *Analytica Chimica Acta*, 1070, 1–28. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.02.036>
- Pérez-Outeiral, J., Elcoroaristizabal, S., Amigo, J. M., e Vidal, M. (2017). Development and validation of a method for the determination of regulated fragrance allergens by High-Performance Liquid Chromatography and Parallel Factor Analysis 2. *Journal of Chromatography A*, 1526, 82–92. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.10.034>
- Pérez, R. L., e Escandar, G. M. (2014). Liquid chromatography with diode array detection and multivariate curve resolution for the selective and sensitive quantification of estrogens in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, 835, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.05.015>
- Picó, Y., Alfarham, A., e Barceló, D. (2017). Analysis of emerging contaminants and nanomaterials in plant materials following uptake from soils. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 94, 173–189. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.07.016>
- Pinto, L., Díaz Nieto, C. H., Zón, M. A., Fernández, H., e de Araujo, M. C. U. (2016). Handling time misalignment and rank deficiency in liquid chromatography by multivariate curve resolution: Quantitation of five biogenic amines in fish. *Analytica Chimica Acta*, 902, 59–69. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.10.043>
- Pisano, P. L., Silva, M. F., e Olivieri, A. C. (2014). Exploration of liquid chromatographic-diode array data for Argentinean wines by extended multivariate curve resolution. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 132, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2013.12.010>
- Real, B. D., Ortiz, M. C., e Sarabia, L. A. (2012). Develop of a multiway chemometric-based analytical method fulfilling regulatory identification criteria: Application to GC-MS pesticide residue analysis. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 910, 122–137. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.05.017>
- Rejczak, T., e Tuzimski, T. (2017). QuEChERS-based extraction with dispersive solid phase extraction clean-up using PSA and ZrO₂-based sorbents for determination of pesticides in bovine milk samples by HPLC-DAD. *Food Chemistry*, 217, 225–233. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.095>
- Rodríguez-Eugenio, N., McLaughlin, M. and Pennock, D. (2018). Soil a hidden pollution: reality. In *American Journal of Public Health* (Vol. 12). <https://doi.org/10.2105/AJPH.12.5.426-b>
- Ruckebusch, C., e Blanchet, L. (2013). Multivariate curve resolution: A review of advanced and tailored applications and challenges. *Analytica Chimica Acta*, 765, 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.028>
- Santos Sousa, E., Pinto, L., e Cesar Ugulino de Araujo, M. (2017). A chemometric cleanup

- using multivariate curve resolution in liquid chromatography: Quantification of pesticide residues in vegetables. *Microchemical Journal*.
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.05.017>
- Savorani, F., Tomasi, G., e Engelsen, S. B. (2010). icoshift: A versatile tool for the rapid alignment of 1D NMR spectra. *Journal of Magnetic Resonance*, 202(2), 190–202.
<https://doi.org/10.1016/j.jmr.2009.11.012>
- Scheel, G. L., e Teixeira Tarley, C. R. (2019). Simultaneous microextraction of carbendazim, fipronil and picoxystrobin in naturally and artificial occurring water bodies by water-induced supramolecular solvent and determination by HPLC-DAD. *Journal of Molecular Liquids*, (xxxx), 111897. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111897>
- Schwanz, T. G., Carpilovsky, C. K., Weis, G. C. C., e Costabeber, I. H. (2019). Validation of a multi-residue method and estimation of measurement uncertainty of pesticides in drinking water using gas chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1585, 10–18.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.11.058>
- Silva, B., Gonzaga, L. V., Fett, R., e Oliveira Costa, A. C. (2019). Improved strategy based on QuEChERS method followed by HPLC/DAD for the quantification of phenolic compounds from *Mimosa scabrella* Bentham honeydew honeys. *Lwt*, 116(April), 108471.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108471>
- Sousa, E. S., Schneider, M. P., Pinto, L., de Araujo, M. C. U., e de Araújo Gomes, A. (2020). Chromatographic quantification of seven pesticide residues in vegetable: Univariate and multiway calibration comparison. *Microchemical Journal*, 152(October 2019), 104301.
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104301>
- Souza Tette, P. A., Guidi, L. R., De Abreu Glória, M. B., e Fernandes, C. (2016). Pesticides in honey: A review on chromatographic analytical methods. *Talanta*, 149, 124–141.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.11.045>
- Taheran, M., Naghdi, M., Brar, S. K., Verma, M., e Surampalli, R. Y. (2018). Emerging contaminants: Here today, there tomorrow! *Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management*, Vol. 10, p. 122–126. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2018.05.010>
- Tajabadi, F., Ghambarian, M., Yamini, Y., e Yazdanfar, N. (2016). Combination of hollow fiber liquid phase microextraction followed by HPLC-DAD and multivariate curve resolution to determine antibacterial residues in foods of animal origin. *Talanta*, 160, 400–409. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.07.035>
- Tauler, R. R. (1995). Multivariate curve resolution applied to second order data. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 30(1), 133–146. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TFP-3YMFRT3-P/2/9215fe58c8a892e1f22bf1411608706e>
- Teófilo, R. F., e Ferreira, M. M. C. (2006). Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. *Química Nova*, 29(2), 338–350.
<https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000200026>
- Tomasi, G., Savorani, F., e Engelsen, S. B. (2011). Icosshift: An effective tool for the alignment

- of chromatographic data. *Journal of Chromatography A*, 1218(43), 7832–7840. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.08.086>
- Tomasi, G., Van Den Berg, F., e Andersson, C. (2004). Correlation optimized warping and dynamic time warping as preprocessing methods for chromatographic data. *Journal of Chemometrics*, 18(5), 231–241. <https://doi.org/10.1002/cem.859>
- Tuzimski, T., e Sherma, J. (2015). *High Performance Liquid Chromatography in Pesticide Residue Analysis*. 582.
- Valderrama, P., e Braga, J. W. B. (2009). Estado da Arte de Figuras de Mérito de Calibração Multivariada. *Química Nova*, 32(5), 1278–1287. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000500034>
- Vosough, M., e Mojdehi, N. R. (2011). Fast liquid chromatography-diode array detection assisted by chemometrics for quantification of seven ultraviolet filters in effluent wastewater. *Talanta*, 85(4), 2175–2181. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.07.068>
- Vosough, M., e Tehrani, S. M. (2018). Development of a fast HPLC-DAD method for simultaneous quantitation of three immunosuppressant drugs in whole blood samples using intelligent chemometrics resolving of coeluting peaks in the presence of blood interferences. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1073(June 2017), 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.12.012>
- Wu, H. L., Nie, J. F., Yu, Y. J., e Yu, R. Q. (2009). Multi-way chemometric methodologies and applications: A central summary of our research work. *Analytica Chimica Acta*, 650(1), 131–142. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.05.041>
- Xu, W., Wang, X., e Cai, Z. (2013). Analytical chemistry of the persistent organic pollutants identified in the Stockholm Convention: A review. *Analytica Chimica Acta*, 790, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.04.026>
- Yang, X., Luo, J., Duan, Y., Li, S., e Liu, C. (2018). Simultaneous analysis of multiple pesticide residues in minor fruits by ultrahigh-performance liquid chromatography/hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Food Chemistry*, 241(September 2017), 188–198. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.102>
- Zhao, Y., Yuan, Y., Chen, J., Li, M., e Pu, X. (2018). Chemometrics-enhanced high performance liquid chromatography strategy for simultaneous determination on seven nitroaromatic compounds in environmental water. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 174(October 2017), 149–155. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2017.10.022>
- Zuloaga, O., Navarro, P., Bizkarguenaga, E., Iparraguirre, A., Vallejo, A., Olivares, M., e Prieto, A. (2012). Overview of extraction, clean-up and detection techniques for the determination of organic pollutants in sewage sludge: A review. *Analytica Chimica Acta*, 736, 7–29. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.05.016>

APÊNDICE A

FIGURAS

Figura A 1- Perfis cromatográficos recuperados por MCR-ALS para o nível quatro da adição de padrão para amostra de **PIMENTÃO**. **a)** Região I (CBZ), **b)** Região II (TBZ e FBZ), **c)** Região III (CBF) e **d)** Região IV (CBR, FLT e NFT). CBZ (—), TBZ (—), FBZ (—), CBF (—), CBR (—), FLT (—), NFT (—). De **a1-d1** os perfis espectrais recuperados. Em cinza (—) são os interferentes e seus respectivos perfis espectrais.

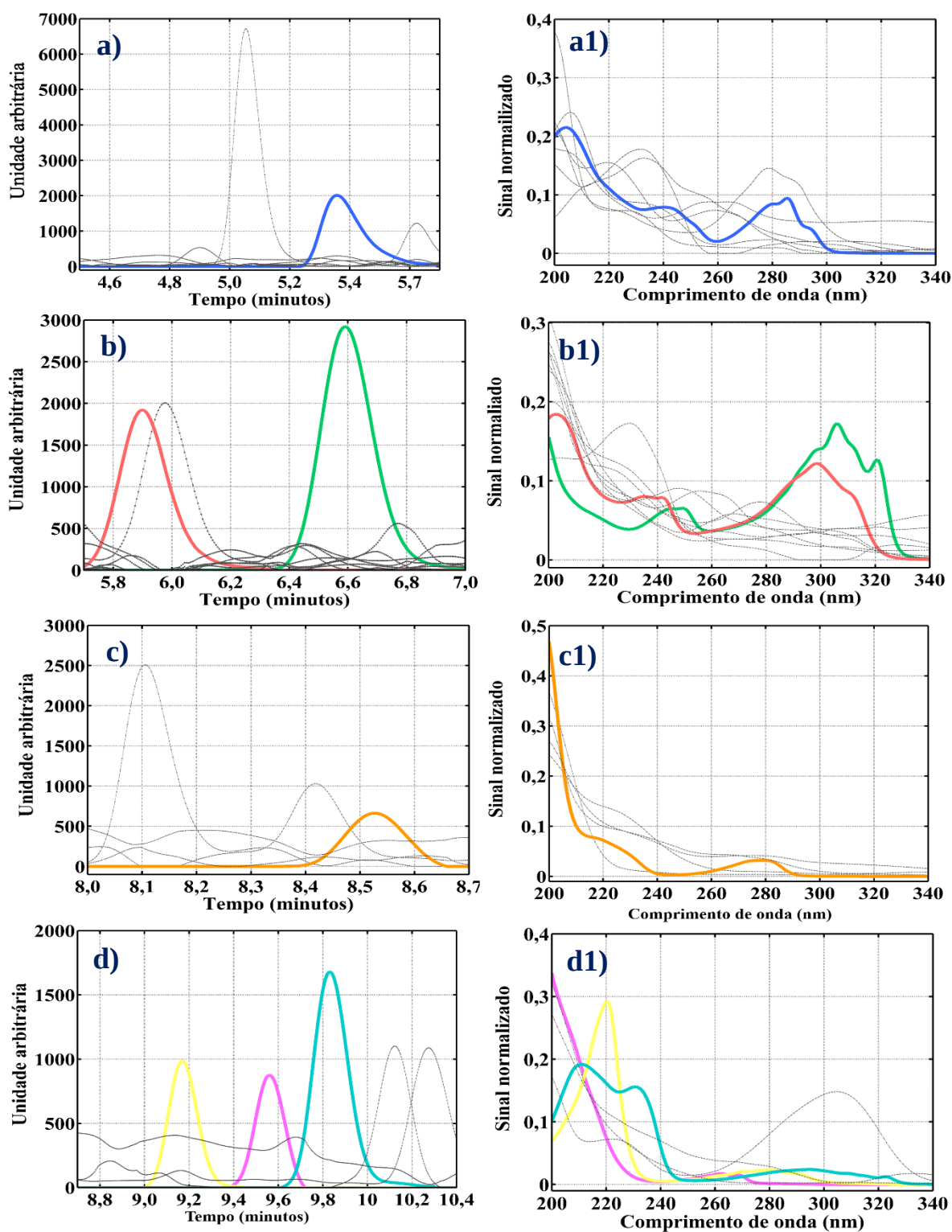


Figura A 2 - Perfis cromatográficos recuperados por MCR-ALS para o nível quatro da adição de padrão para amostra de **COUVE**. **a)** Região I (CBZ), **b)** Região II (TBZ e FBZ), **c)** Região III (CBF) e **d)** Região IV (CBR, FLT e NFT). CBZ (—), TBZ (—), FBZ (—), CBF (—), CBR (—), FLT (—), NFT (—). De **a1-d1** os perfis espectrais recuperados. Em cinza (—) são os interferentes e seus respectivos perfis espectrais.

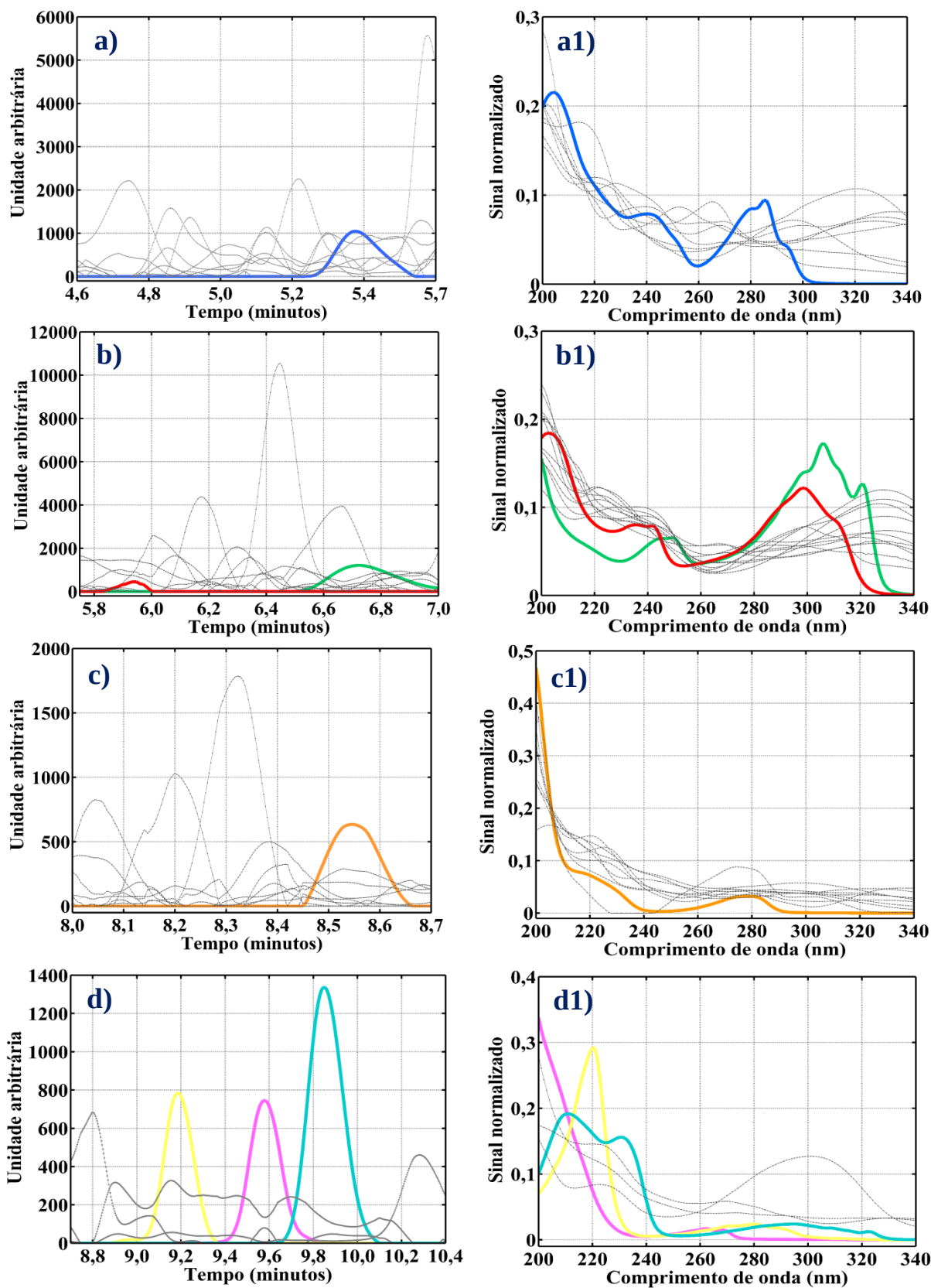


Figura A 3 - Perfis cromatográficos recuperados por MCR-ALS para o nível quatro da adição de padrão para amostra de **ALFACE**. **a)** Região I (CBZ), **b)** Região II (TBZ e FBZ), **c)** Região III (CBF) e **d)** Região IV (CBR, FLT e NFT). CBZ (—), TBZ (—), FBZ (—), CBF (—), CBR (—), FLT (—), NFT (—). De **a1-d1** os perfis espectrais recuperados.

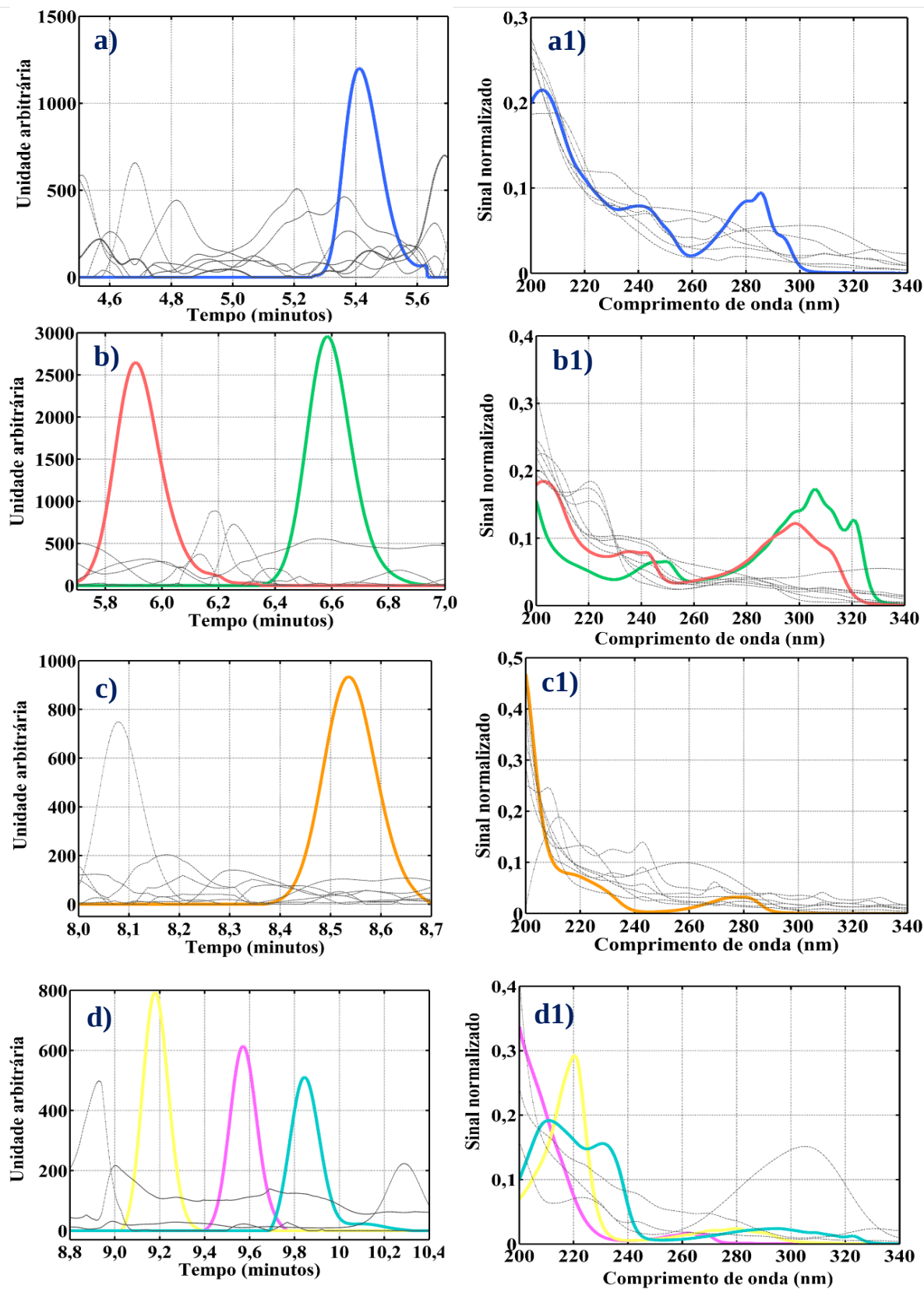


Figura A 4 - Perfis cromatográficos recuperados por MCR-ALS para o nível quatro da adição de padrão para amostra de **CENOURA**. **a)** Região I (CBZ), **b)** Região II (TBZ e FBZ), **c)** Região III (CBF) e **d)** Região IV (CBR, FLT e NFT). CBZ (—), TBZ (—), FBZ (—), CBF (—), CBR (—), FLT (—), NFT (—). De **a1-d1** os perfis espectrais recuperados.

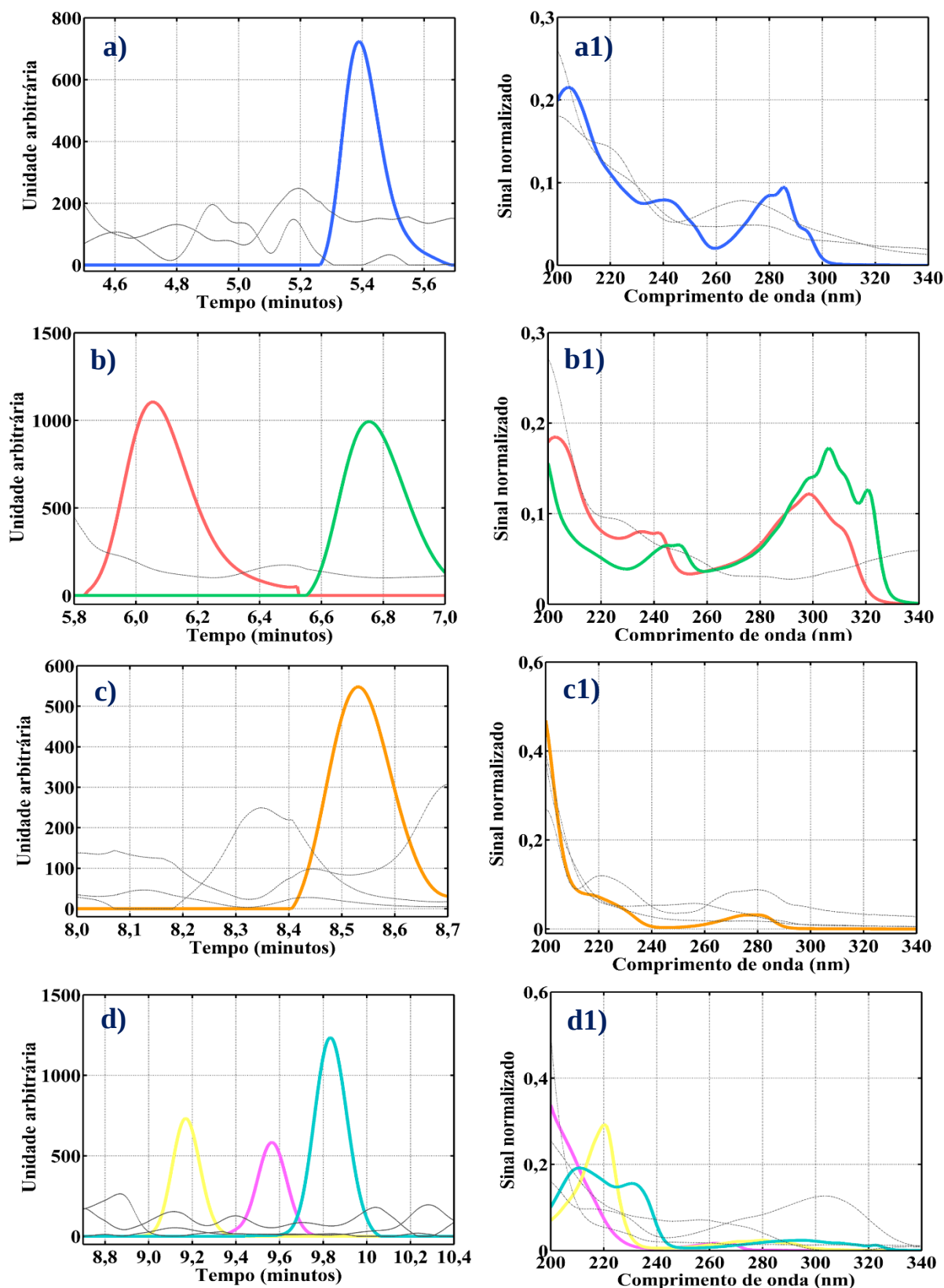
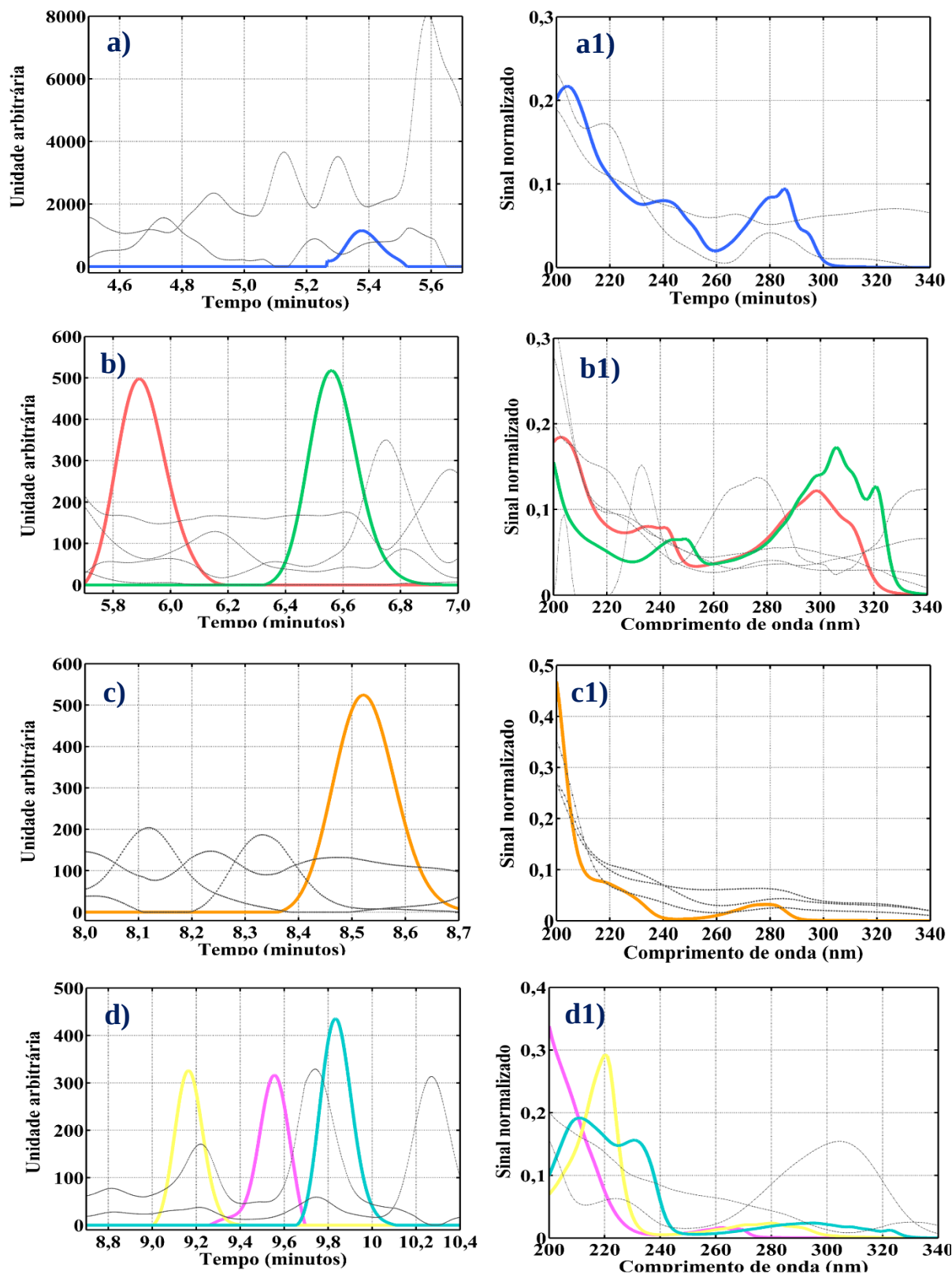


Figura A 5 - Perfis cromatográficos recuperados por MCR-ALS para o nível quatro da adição de padrão para amostra de **BETERRABA**. **a)** Região I (CBZ), **b)** Região II (TBZ e FBZ), **c)** Região III (CBF) e **d)** Região IV (CBR, FLT e NFT). CBZ (—), TBZ (—), FBZ (—), CBF (—), CBR (—), FLT (—), NFT (—). De **a1-d1** os perfis espectrais recuperados.



APÊNDICE B

TABELA

Tabela 1A- Apresentação dos testes estatísticos de Student (t) e Distribuição F de Fischer-Snedecor à 95%.

TESTE ESTATÍSTICO	CBZ		TBZ		FBZ		CBF		CBR		FLT		NFT	
	t ^a	F ^b	t ^a	F ^b	t ^a	F ^b	t ^a	F ^b	t ^a	F ^b	t ^a	F ^b	t ^a	F ^b
Tomate	0,18	2,18	0,70	2,31	0,62	2,02	0,49	1,64	0,93	4,05	0,74	2,34	1,38	4,63
Pimentão	0,54	2,08	0,55	3,14	0,49	1,76	0,80	2,27	0,99	2,16	1,00	3,65	1,36	5,07
Alface	0,45	1,82	0,74	2,82	0,70	2,52	0,74	2,41	1,20	3,81	0,64	2,28	1,96	4,58
Cenoura	1,02	4,35	0,82	2,86	0,89	2,69	0,89	3,33	1,17	3,0	0,73	2,25	1,15	3,79
Beterraba	0,63	2,69	0,75	2,84	0,79	2,84	0,96	2,92	1,09	3,0	0,69	2,53	1,18	4,58

^a Teste t de Student entre duas amostras presumindo variâncias equivalentes e probabilidade associada com uma distribuição bicaudal à 95% de confiança, tendo em vista que a hipótese da diferença entre as médias é igual a zero, não há diferença entre as médias. Estudo realizado com 8 pontos e 6 graus de liberdade (G.L) que apresenta com t crítico bicaudal = 2,4469. ^b Distribuição F de Fischer-Snedecor à 95% de confiança e 3 graus de liberdade, tendo em vista a observação de quatro pontos de concentração. $F_{0,95} = 9,276$.

APÊNDICE C

ARTIGOS

1. Artigo da tese

Microchemical Journal 134 (2017) 131–139



Contents lists available at ScienceDirect

Microchemical Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/microc

A chemometric cleanup using multivariate curve resolution in liquid chromatography: Quantification of pesticide residues in vegetables



Emanuella Santos Sousa, Licarion Pinto, Mario Cesar Ugulino de Araujo *

Laboratório de Automação e Instrumentação em Química Analítica e Quimiometria (LAQA) Universidade Federal da Paraíba, CCEN, Departamento de Química, Caixa Postal 5093, CEP 58051-970 João Pessoa, PB, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 March 2017

Received in revised form 25 May 2017

Accepted 27 May 2017

Available online 29 May 2017

Keywords:

Pesticide residues

Vegetables

Liquid chromatography

Multivariate curve resolution

Chemometric cleanup

ABSTRACT

Both extraction and chemical cleanup are steps performed when the official AOAC 2007.01 QuEChERS method is used. The chemical cleanup step is required because many co-extractives may still be present after the whole samples extraction; however, it may reduce recovery of certain analytes due to non-selectivity of this step. In addition, unexpected constituents may still interfere with the analysis even when chemical cleanup is carried out, impairing univariate quantification. A chemometric cleanup using MCR-ALS is proposed as an alternative to the QuEChERS chemical cleanup. The performance of the proposed approach was demonstrated through quantification of seven pesticide residues (Carbendazim, Thiabendazole, Fuberidazole, Carbofuran, Carbaryl, 1-naphthol, and Flutriafol) in four non-spiked vegetable samples using HPLC-DAD. With the proposed strategy, it was possible to perform a reliable quantification despite the presence of co-eluted constituents (analytes and interferents), peak shift, band shape changes and avoiding the chemical cleanup with low analyte losses and LOD.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

2. Outros artigos publicados durante o doutorado relacionados a calibração de ordem superior e cromatografia à líquido.

Microchemical Journal 152 (2020) 104301



Contents lists available at ScienceDirect

Microchemical Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/microc



Chromatographic quantification of seven pesticide residues in vegetable: Univariate and multiway calibration comparison



Emanuella Santos Sousa^a, Mateus P. Schneider^b, Licarion Pinto^{c,*},
Mario Cesar Ugulino de Araujo^{a,*}, Adriano de Araújo Gomes^{b,*}

^a Laboratório de Automação e Instrumentação em Química Analítica e Quimiometria (LAQA) Universidade Federal da Paraíba, CCEN, Departamento de Química, Caixa Postal 5093, CEP 58051-970, João Pessoa, PB, Brasil

^b Laboratório de Quimiometria e Instrumentação Analítica-LQIA. Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Agronomia 9500, Porto Alegre -RS, Brasil

^c Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Recife, PE 50670-901, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Pesticide residues
Vegetables
Liquid chromatography
Multivariate curve resolution
Second order advantage

ABSTRACT

Second order algorithms have been used in many chromatographic data analyses to overcome the interference drawback of an unexpected coeluted constituent, however the majority of the works partially coelute the analytes to reduce the elution time, this requires the multiway calibration even if an unexpected constituent is not present at the sample. It is always preferable to perform a univariate quantification than perform a multiway calibration. For this purpose, it is necessary to use a detection system whose selectivity reduces the probability of interferences, for instance a liquid chromatography with mass spectrometry (LC-MS), unfortunately the operating costs can be considerably high. In this work, a comprehensive study of univariate and multiway calibration was performed for the quantification of seven pesticide residues in vegetables using a liquid chromatography with diode array detector (LC-DAD). The univariate and multiway calibration comparison study was performed along the data acquired for a full validation of the univariate methodology, where the analytes were separated in the column previously to detection. At the vegetable samples analysis, it was shown that the results are the same when the interference is not present and only the multiway approach leads to accurate results when it is present. Performing the multiway calibration only when it is necessary, leading to faster data analyses, and eliminating the need of another injection, revalidation or resampling when an interferent is present and reducing the analysis cost by the use of a LC-DAD system. In addition, in this work it is possible to evaluate the multiway calibration efficiency comparing the results with the well established univariate calibration, which was done for the first time, using the same data, as long as the authors' knowledge.