



UNIVERSIDADE  
E D U A R D O  
MONDLANE

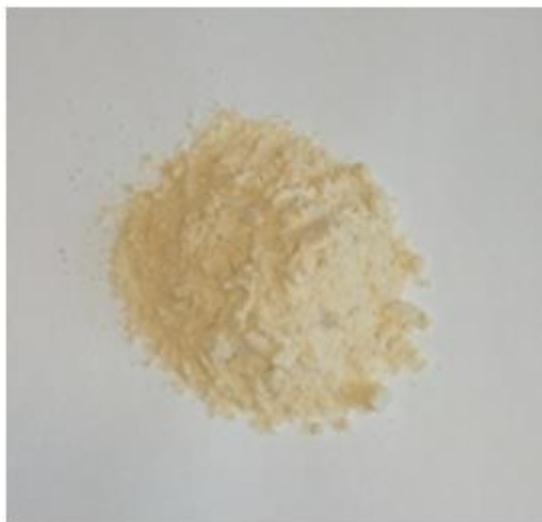
FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Dissertação para Obtenção do Grau de Mestrado em Química e Processamento de Recursos**

**Locais**

**Tema:** Modificação do método QuEChERS pela incorporação da proteína da semente da moringa para a extração e quantificação de pesticidas em amostras de peixes e legumes



**Autor:** Silvestre Lucas Muiambo

Maputo, Fevereiro de 2023



**FACULDADE DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**Dissertação para Obtenção do Grau de Mestrado em Química e Processamento de Recursos**

**Locais**

**Tema:** Modificação do método QuEChERS pela incorporação da proteína da semente da moringa para a extracção e quantificação de pesticidas em amostras de peixes e legumes

**Autor:**

Silvestre Lucas Muiambo

**Supervisor:**

Prof. Doutor Eutilério F.C. Chaúque  
(Professor Auxiliar)

**Co-supervisora:**

Mestre Noor Jehan Gulamussen  
(Assistente Universitário)

Maputo, Fevereiro de 2023

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar agradeço a DEUS pela criação, saúde e protecção em todos os dias da minha vida;

Endereço um especial agradecimento a toda equipa do trabalho em particular aos meus supervisores Prof. Doutor Eutilério Felizardo Crisino Chaúque e a mestre Noor Jehan Gulamussen, pela confiança que depositaram em mim e por todo apoio prestado durante a realização da presente pesquisa;

À Prof<sup>a</sup>. Doutora Fung Dai Kin pelo apoio dado nas correcções e orientações durante a elaboração da presente dissertação vão os meus agradecimentos;

Os meus agradecimentos são extensivos a todos os nossos colaboradores das Repúblicas da África do Sul e da Zâmbia, em particular ao Professor Doutor Luke Chimuka e ao Prof. Doutor Imassiku Nhambe;

Ainda aproveito este momento para agradecer o Fundo Nacional de Investigação pelo financiamento da presente pesquisa e à Universidade Witwatersrand (África do Sul) pela disponibilização dos equipamentos e reagentes, para além do suporte técnico prestado pelo Doutor Eric Murif na assistência durante as análises em GCxGC/TOFMS;

À minha família em especial à minha esposa Celestina Muiambo, aos meus filhos Ivanildo Muiambo e Shanaya Muiambo, por todo apoio moral durante esta longa caminhada;

A todos que de forma directa ou indirecta contribuíram para a realização deste trabalho vão os meus agradecimentos.

## **Dedicatória**

Este trabalho é dedicado à minha esposa Celestina Muiambo, pelo companheirismo e apoio incondicional em todos os momentos da minha formação.

---

(Silvestre Lucas Muiambo)

## **Declaração**

Eu, Silvestre Lucas Muiambo, declaro por minha honra que a presente dissertação é da minha autoria segundo as metodologias e referências nela apresentadas, e que nunca foi apresentada em nenhuma instituição de ensino para a obtenção de um grau académico.

Maputo, Fevereiro de 2023

---

(Silvestre Lucas Muiambo)

## RESUMO

Alguns compostos persistem no meio ambiente e estudos revelam a sua acção negativa na saúde pública, como a desregulação do sistema endócrino. Sendo a cadeia alimentar a principal via da sua propagação no ambiente, a sua quantificação em produtos alimentares tornou-se muito importante. Neste estudo, foi validada uma modificação do método QuEChERS baseada na substituição do adsorvente *Primary Secondary Amine* (PSA) pela proteína da semente de moringa (Mor-p). Os testes de recuperação analítica usando padrões  $\beta$ -HCH,  $\gamma$ -HCH, cipermetrina, p,p'-DDD, p,p'-DDT, 4-nonilfenol e profenofos foram feitos usando ácido acético a 1% em acetonitrilo: metanol (90:10) como solvente de extracção. A identificação e quantificação dos compostos orgânicos em GC-MS apresentou recuperações analíticas em amostras de couve que variaram de 104-107% para  $\beta$ -HCH, 74-110% para  $\gamma$ -HCH, 69-90% para cipermetrina, 84-94% para p,p'-DDD, 86-108% para p,p'-DDT, 81-114% para 4-nonilfenol e 80-94% para profenofos. Em amostras de peixe, as recuperações analíticas variaram de 71-83% para  $\beta$ -HCH, 91-96% para  $\gamma$ -HCH, 71-82% para cipermetrina, 86-88% para p,p'-DDD, 74-88% para p,p'-DDT, 102-110% para 4-nonilfenol e 58-59% para profenofos. Os resultados das análises de amostras em GCxGC/TOFMS, demonstraram a presença de  $\gamma$ -HCH, p,p'-DDD e p,p'-DDT em amostras de couve,  $\beta$ -HCH, cipermetrina, p,p'-DDD, p,p'-DDT, 4-nonilfenol e profenofos em amostras de repolho. Por outro lado,  $\gamma$ -HCH, p,p'-DDD e 4-nonilfenol foram quantificados em amostras de peixe. As concentrações destes compostos nas amostras analisadas estiveram acima dos limites máximos residuais estabelecidos pela Codex alimentarius, excepto a cipermetrina. Os resultados de validação analítica indicaram potencial aplicação da Mor-p como adsorvente alternativo para a quantificação de compostos orgânicos persistentes de alimentos crus, incluindo vegetais e peixes, com a excepção do profenofos na matriz do peixe. A avaliação dos índices de toxicidade dos pesticidas (PTI) com os valores de 31.83, 30.50 e 23.98 para couve, repolho e peixe, respectivamente, evidencia um risco para a saúde associado ao consumo destes alimentos vendidos em mercados moçambicanos.

Palavras-chave: Validação, QuEChERS, Desreguladores Endócrinos, GC-MS, Tilapia, Legumes

## Abreviaturas, acrónimos, síglas e símbolos

% Rec	Recuperação analítica em percentagem
%RSD	Desvio padrão relativo em percentagem
AF	Alquilfenóis
4-NP	4-nonilfenol
BDL	<i>Below detection limit</i> em português “abaixo do limite de detecção”
C <sub>exp</sub>	Concentração obtida experimentalmente
C <sub>i</sub>	Concentração do composto (mg.kg <sup>-1</sup> ) na amostra
C <sub>p</sub>	É a concentração média de resíduos do composto nas amostras de cada espécie
C <sub>t</sub>	Concentração teórica ou esperada
D	Ingestão média diária
DDD	Dicloro-difenildicloroetano
DDT	Dicloro-difeniltricloroetano
EDCs	<i>Endocrine disrupting compounds</i> em português “compostos desreguladores endócrinos”
DNTs	Doenças infecciosas não transmissíveis
EDI	Ingestão diária estimada para pessoa adulta
EDI*	Ingestão diária estimada para criança
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada ao espectrómetro de massa
GCxGC/TOFMS	Cromatografia gasosa bidimensional acoplada ao espectrómetro com tempo de voo

HI	Índice do risco à saúde para pessoa adulta
HI*	Índice do risco à saúde para uma criança
HQ	Quociente de perigo
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
m	Declive da recta ou curva de calibração
$m_d$	A média das respectivas concentrações
MO	Moringa oleífera
Mor-p	Proteína da semente da moringa
MRL	Limite máximo residual ou concentração máxima permitida
$n_1$ e $n_2$	Número de réplicas ensaiadas para cada método
PSA	<i>Primary secondary amine</i> em português “amina primária secundária
PTI	Índice de toxicidade do pesticida
OMS	Organização mundial da saúde
QuEChERS	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safety</i> em português “rápido, fácil, barato, efectivo, robusto e seguro”
RSA	República da África do Sul
$s_1$ e $s_2$	Desvios-padrão amostrais das médias geradas pelos dois métodos
sp	É o desvio padrão das concentrações experimentais
$s_{y/x}$	Desvio padrão residual da linha de regressão
$t_{ob}$	Valor experimental, estimado a partir das médias dos dois métodos
Tr	Tempo de retenção
$\beta$ -HCH	Beta hexaclorociclohexano
$\gamma$ -HCH	Beta hexaclorociclohexano
v	Número de graus de liberdade

## Índice de conteúdos

1 INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Perguntas de pesquisa .....	2
1.2 Relevância da pesquisa .....	2
1.3 Objectivos .....	4
1.3.1 Geral .....	4
1.3.2 Específicos .....	4
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	5
2.1 Compostos desreguladores endócrinos .....	5
2.2 Pesticidas .....	7
2.2.1 Contaminação e propagação dos pesticidas no ambiente .....	9
2.2.2 Alguns pesticidas e compostos com efeitos de desregulação endócrina.....	10
2.3 Compostos desreguladores endócrinos emergentes .....	18
2.4 Grupo de alimentos de origem vegetais e animal alvo de contaminação por EDCs.....	22
2.4.1 Culturas de repolho e couve.....	22
2.4.2 Peixes de água doce .....	25
2.5 Determinação de pesticidas em amostras de alimentos .....	28
2.5.1 Métodos cromatográficos .....	28
2.5.2 Cromatografia gasosa .....	29
2.5.3 Método de QuEChERS.....	32
2.6 Cultura da moringa .....	34
2.7 Validação de um método analítico.....	35
2.7.1 Especificidade ou selectividade .....	36
2.7.2 Linearidade .....	36
2.7.3 Limite de detecção (LOD) .....	36
2.7.4 Limite de quantificação (LOQ).....	37
2.7.5 Precisão de um método analítico .....	37
2.7.6 Exactidão de um método analítico.....	38
2.7.7 Robustez .....	38
3 PARTE EXPERIMENTAL .....	39
3.1 Metodologia.....	39
3.1.1 Colheita de amostras.....	39

3.1.2	Optimização das condições da extracção.....	41
3.1.3	Extracção de pesticidas pelo método QuEChERS.....	43
3.1.4	Condições analíticas usadas em cromatografia gasosa.....	45
3.1.5	Avaliação estatística dos resultados.....	47
3.1.6	Avaliação do risco para a saúde do consumidor por ingestão de vegetais e peixe contaminados por poluentes orgânicos persistentes .....	48
4	RESULTADOS .....	50
4.1	Resultados da optimização das condições de extracção .....	50
4.2	Resultados da linearidade, limites de detecção e de quantificação.....	50
4.3	Resultados dos testes da exactidão e da precisão do método de extracção.....	53
4.4	Resultados do teste da selectividade dos adsorventes.....	55
4.5	Resultados de análise de amostras reais.....	56
4.5.1	Resultados da avaliação do risco para a saúde do consumidor.....	62_
5	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS .....	64
5.1	Optimização das condições da extracção.....	64
5.2	Teste de linearidade, limites de detecção e quantificação .....	64
5.3	Avaliação da recuperação analítica e precisão do método de extracção.....	64
5.4	Teste de robustez .....	66
5.5	Selectividade dos adsorventes .....	66
5.6	Compostos orgânicos persistentes determinados nas amostras analisadas .....	67
5.7	Avaliação do risco à saúde do consumidor.....	70
6	CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES .....	72
6.1	Conclusões.....	72
6.2	Recomendações .....	73
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	74
	ANEXOS .....	91

## Índice Tabelas

Tabela 1. MRLs permitidos para diferentes EDCs nas matrizes de vegetais e peixes.....	21
Tabela 2. Níveis dos factores avaliados e rendimento da extracção .....	42
Tabela 3. Iões característicos de cada composto pesquisado .....	46
Tabela 4. Resultados do estudo da linearidade, limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) do método analítico na matriz da couve.....	51
Tabela 5. Resultados do estudo da linearidade, limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) do método analítico na matriz do peixe .....	52
Tabela 6 Resultados dos testes de recuperação e de precisão do método em amostras de couve (P =0.05; t <sub>crit.</sub> =2.78).....	53
Tabela 7 Resultados dos testes de recuperação e de precisão do método em amostras de peixe (P = 0.05).....	54
Tabela 8 Resultados da análise de amostras de couve colhidas em diferentes mercados.....	57
Tabela 9 Resultados da análise de amostras de repolho colhidas em diferentes mercados .....	58
Tabela 10 Resultados da análise de amostras peixe colhidas em diferentes mercados .....	59
Tabela 11 Resultados de outros estudos feitos em outras regiões do mundo .....	60

## Índice de figuras

Figura 1. Fórmula estrutural do profenofos ou O-(4-bromo-2-clorofenil) O-etil S-propilfosfotioato.....	10
Figura 2. Fórmula estrutural da cipermetrina ou $\alpha$ -cyano-3-fenoxibenzil-3-(2,2-dimetil 2,2-diclorovinil)-2,2-ciclopropano carboxilato .....	13
Figura 3. Fórmulas estruturais de p,p'-(diclorodifenil)-1,1,1-tricloroetano (i) e p,p'-(diclorodifenil)-1,1-dicloroetano (ii).....	17
Figura 4. Fórmula estrutural do hexaclorociclobenzeno.....	18
Figura 5. Fórmula estrutural de 4-nonilfenol .....	20
Figura 6. Repolho e sua classificação taxonómica.....	24
Figura 7. Couve e sua classificação taxonómica.....	25
Figura 8. <i>Oreochromis mossambicus</i> (Tilápia de Moçambique).....	27
Figura 9. Imagem da <i>Clarias gariepinus</i> .....	28
Figura 10. Exemplo de um cromatograma de separação de cinco componentes em mistura..	29
Figura 11. Diagrama de um sistema de cromatografia gasosa.....	31
Figura 12. Imagem ilustrativa da <i>Moringa oleífera</i> (i), das suas sementes (ii) e da proteína das sementes (iii) .....	35
Figura 14. Esquema dos sistemas cromatográficos usados para a leitura.....	46
Figura 15. Gráfico de efeitos principais para a média do sinal A/API .....	50
Figura 16. Cromatogramas da mistura de padrões analíticos na matriz da couve usando os adsorventes PSA (a) e Mor-p (b) .....	55
Figura 17. Cromatogramas da mistura de padrões analíticos na matriz de peixe usando o adsorvente PSA (a) e Mor-p (b).....	56
Figura 18 Valores dos quocientes de perigo (HQ) e dos índices de toxicidade dos pesticidas (PTI) para os diferentes pesticidas quantificados.....	62
Figura 19 Valores do perigo calculados para indivíduos adultos (i) e para crianças (ii) .....	63

## Índice de anexos

Ilustração 1 A.1.7 Curva de calibração para análise de profenofos .....	93
Ilustração 2. A.2.1 Curva de calibração para análise de $\beta$ -HCH .....	94
Ilustração 3. A.2.2 Curva de calibração para análise de $\gamma$ -HCH.....	94
Ilustração 4. A.2.3 Curva de calibração para análise da cipermetrina .....	94
Ilustração 5. A.2.4 Curva de calibração para análise do p,p'-DDD.....	95
Ilustração 6. A.2.5 Curva de calibração para análise do p,p'-DDT .....	95
Ilustração 7. A.2.6 Curva de calibração para análise do 4-nonilfenol .....	96
Ilustração 8. A.2.7 Curva de calibração para análise de profenofos .....	96
Ilustração 9. A.3.1 Curva de calibração para análise de $\beta$ -HCH .....	97
Ilustração 10. A.3.2 Curva de calibração para análise de $\gamma$ -HCH.....	97
Ilustração 11. A.3.3 Curva de calibração para análise da cipermetrina .....	97
Ilustração 12. A.3.4 Curva de calibração para análise de p,p'-DDD.....	98
Ilustração 13. A.3.5 Curva de calibração para análise de p,p'-DDT .....	98
Ilustração 14. A.3.6 Curva de calibração para análise de 4-nonilfenol.....	98
Ilustração 15. A.3.7 Curva de calibração para análise de profenofos .....	99
Ilustração 16. B.1 Características espectral e fórmula estrutural de $\beta$ -HCH .....	100
Ilustração 17. B.2 Características espectral e fórmula estrutural de $\gamma$ -HCH.....	100
Ilustração 18. B.3 Características espectral e fórmula estrutural da cipermetrina .....	101
Ilustração 19. B.4 Características espectral e fórmula estrutural do p,p'-DDD.....	101
Ilustração 20. B.5 Características espectral e fórmula estrutural do p,p'-DDT .....	102
Ilustração 21. B.6 Características espectral e fórmula estrutural do 4-nonilfenol .....	102
Ilustração 22. B.7 Características espectral e fórmula estrutural de profenofos .....	103
Ilustração 23. B.8 Características espectral e fórmula estrutural da trifenilfosfina .....	103
Ilustração 24. C1 Valores do índice de toxicidade dos pesticidas (PTI) e dos quocientes de perigo (HQ), para os diferentes pesticidas quantificados.....	104
Ilustração 25. C2 Avaliação do risco de exposição do consumidor adulto e crianças, na ingestão da couve e repolho frescos (38.8 g/pessoa. dia) .....	105
Ilustração 26. C3 Avaliação do risco de exposição do consumidor adulto e crianças, na ingestão do peixe de águas frescas (6.1 g/pessoa. dia) .....	106

# 1 INTRODUÇÃO

A agricultura é uma das actividades praticadas pelo homem desde os tempos primordiais, cuja finalidade é providenciar alimentos e outros bens para melhoria da qualidade de vida da sociedade. Entretanto, além aumentar a produtividade, a agricultura pode constituir uma fonte de contaminação do meio ambiente, devido a práticas intensivas de fertilização do solo e controlo de pragas com recurso a pesticidas naturais ou sintéticos (Sultan *et al.*, 2013; Naqvi *et al.*, 2014; Combarous, 2017). Todavia, certas pragas têm desenvolvido resistência aos pesticidas convencionais, obrigando o emprego de quantidades cada vez maiores destas substâncias em culturas. Como resultado, os pesticidas acumulam-se em produtos vegetais, animais assim como no solo, constituindo desta forma um perigo para o ecossistema e à saúde dos consumidores (Yu *et al.*, 2006 e Naqvi *et al.*, 2014).

Certos estudos revelam que alguns pesticidas e seus derivados são capazes de alterar o equilíbrio hormonal e comprometer o desenvolvimento embrionário entre outros efeitos adversos à saúde de organismos vivos e seus descendentes, facto que tem sido relacionado com a diminuição da biodiversidade (Roelofs *et al.*, 2014; Monneret, 2017; Slama *et al.*, 2017).

Alguns pesticidas são denominados compostos desreguladores endócrinos (EDCs) devido à sua acção na alteração do funcionamento do sistema endócrino ( Rylander *et al.*, 2014; Costa *et al.*, 2015; Bernabeu *et al.*, 2016; Le Thi *et al.*, 2016; Combarous, 2017). Outros agro-químicos para além dos efeitos acima mencionados são relacionados com a eminência de cancro e mutações genéticas em organismos afectados (Sultan *et al.*, 2013).

Em Moçambique, a tendência em adoptar uma agricultura mecanizada torna cada vez mais prováveis a contaminação e acumulação de pesticidas no solo e no ecossistema aquático. Como consequência, as culturas cultivadas nesses solos, o habitat aquático e os consumidores constituem potenciais alvos destes poluentes. Actualmente pouco se sabe das concentrações destes compostos em produtos agrícolas e pesqueiros, assim como os níveis de exposição dos consumidores destes alimentos. Estas lacunas podem estar aliadas à não exiguidade dos métodos de extracção em uso, associada ao alto custo dos adsorventes de limpeza dos extractos na análise de pesticidas em alimentos. Isto constitui um grande impasse para as

análises ligadas à quantificação de pesticidas em países com restrições financeiras tais como Moçambique. Por isso, o presente trabalho de pesquisa pretende desenvolver uma metodologia de extração com a incorporação da proteína das sementes da moringa na etapa de limpeza do em substituição da proteína *primary secondary amine* (PSA).

### **1.1 Perguntas de pesquisa**

- ✓ Que estratégias acessíveis podem ser usadas para a identificação e quantificação de compostos orgânicos desreguladores endócrinos em alimentos comuns?
- ✓ Qual é a concentração de compostos desreguladores endócrinos nos produtos pesqueiros e agrícolas vendidos em mercados informais Moçambicanos?
- ✓ Que alterações podem ser feitas ao método *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe* (QuEChERS) para torná-lo acessível e aplicável em países com restrições financeiras incluindo Moçambique?
- ✓ A proteína da semente da moringa pode ser usada como substituto do PSA no método QuEChERS?
- ✓ Quais são os benefícios de usar a proteína das sementes de moringa, olhando para a perspectiva de custos de análise?

### **1.2 Relevância da pesquisa**

Os desafios ligados à segurança alimentar para responder ao crescente aumento demográfico e à falta de terra cultivável em todo o mundo, tornaram necessário o uso de técnicas de produção modernas, com vista ao aumento da produção e produtividade de culturas. Contudo, diferentes pragas têm afectado o desenvolvimento dessas culturas (Ali *et al.*, 2019).

Como forma de evitar perdas significativas de culturas por acção de pragas, a aplicação de pesticidas tornou-se imperativa, que em algum momento pode limitar a consciência relativamente às consequências que o uso excessivo destes compostos pode trazer à sociedade.

Alguns pesticidas são conhecidos ou suspeitos de ser desreguladores endócrinos, tendo sido banidos internacionalmente, mas ainda continuam a ser detectados em produtos alimentares de certos países. Por exemplo, na pesquisa feita por Nuapia e colaboradores (2016) em

amostras de feijão, repolho, carne e peixe colhidas na África do Sul, foram detectados aldrin, p,p'-DDT, p,p'-DDE,  $\alpha$ -HCH,  $\beta$ -HCH e  $\gamma$ -HCH.

O comércio livre na Comunidade para o Desenvolvimento do Sul da África (SADC) de que Moçambique faz parte, permite uma circulação de produtos, onde na sua maioria inclui cebola, batata reno, tomate entre outros, comercializados em Moçambique têm a sua origem na República da África do Sul. Também regista-se certas variedades como couve e alface produzidos em Moçambique e que são vendidos no mercado daquele país. A República da África do Sul e outros países vizinhos como Zimbabwe e Zâmbia caracterizam-se por uma agricultura mecanizada, e onde o uso de pesticidas é provavelmente muito intenso. Estas práticas podem levar à contaminação dos rios partilhados com Moçambique tais como os rios Incomáti, Limpopo, Umbelúzi e Zambeze. Esta rede hidrográfica e as trocas comerciais entre estes países aumentam as possibilidades de se encontrar pesticidas desreguladores endócrinos em vegetais e peixes vendidos em mercados locais.

A presença destes compostos em alimentos constitui um risco para a saúde pública, daí que o conhecimento sobre a sua presença e quantidades relativas em alimentos comuns se torna imprescindível para garantir a segurança alimentar, facto que não tem sido conseguido por dificuldades relacionadas com o alto custo das análises destes compostos.

Para superar estas dificuldades, propôs-se investigar metodologias de extracção mais simples e acessíveis para aplicação em análises de rotina de controlo de qualidade de alimentos. É neste contexto que o presente trabalho de pesquisa se centrou na incorporação da proteína extraída das sementes da moringa para a sua aplicação no processo de extracção de pesticidas em alimentos, através da modificação do método pré-estabelecido *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rudge and Safety* vulgarmente designado QuEChERS.

As sementes da moringa constituem um recurso natural renovável e acessível em vários países tropicais incluindo Moçambique. A utilização da proteína destas sementes no lugar da resina sintética ou proteína amina primária secundária (PSA) no método QuEChERS surge como uma alternativa viável para a aplicação deste método em países com limitações financeiras.

Para além de propôr o método de baixo custo, os resultados desta investigação fornecerão uma base de dados sobre os tipos e quantidades relativas de pesticidas presentes em certas

variedades de alimentos agrícolas e pesqueiros consumidos em Moçambique, os quais servirão de indicador do grau de exposição dos consumidores a potenciais compostos desreguladores endócrinos, assim como poderão estimular a definição de políticas de protecção do consumidor por parte de instituições reguladoras competentes.

### **1.3 Objectivos**

#### **1.3.1 Geral**

- ✓ Desenvolver e otimizar o método analítico de extracção simples e quantificação de pesticidas com potencial actividade endócrina em alimentos crus seleccionados em Moçambique.

#### **1.3.2 Específicos**

- ✓ Optimizar o método *QuEChERS* empregando a proteína das sementes de moringa como adsorvente natural renovável;
- ✓ Aplicar o método *QuEChERS* modificado para a extracção de pesticidas seleccionados (por ex. organofosforados (profenofos), piritróides (cipermetrina), organoclorados ( $\gamma$ -HCH,  $\beta$ -HCH, p,p'-DDD e p,p'-DDT) e outros compostos de interesse ambiental como 4-nonilfenol em amostras de repolho, couve, peixe tilápia e peixe gato comercializados em mercados informais das províncias de Maputo, Nampula e Tete;
- ✓ Avaliar o nível de risco da saúde dos consumidores por ingestão de alimentos contaminados por aqueles compostos.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

A agricultura é uma actividade geralmente praticada em solos férteis, preferencialmente junto dos rios, aquíferos e outras fontes de água. A crescente necessidade em satisfazer a demanda do mercado tem obrigado o sector agrário a adoptar medidas que visam aumentar os níveis de produção de alimentos, as quais incluem-se a aplicação de fertilizantes e pesticidas sintéticos, que podem contaminar o solo e recursos hídricos levando à poluição destes compartimentos ambientais (Veiga *et al.*, 2006).

A poluição química das águas por exemplo, pode representar uma ameaça para o ambiente aquático, com efeitos de toxicidade para a biota, com as consequentes perdas da biodiversidade, e esta ameaça pode ser extensiva à saúde pública (Thompson *et al.*, 2017). Devido à sua toxicidade, certos pesticidas foram banidos no mercado internacional mas ainda há suspeitas da sua utilização ilegal em certos países, o que pode ser a principal causa da sua detecção em produtos alimentares. A título de exemplo, em um estudo realizado no Gana por Amoah e colaboradores (2006), foi determinado lindane em amostras de couve. Ainda no Gana Ko e colaboradores (2012), reportaram a presença de pesticidas organoclorados em amostras de peixe, vegetais e frutas. Em outros estudos como o de Molina-Ruiz e colaboradores (2014), também determinaram os pesticidas lindane, 4,4'-DDD, e 4,4'-DDT em amostras de peixe. Raslan e colaboradores (2018) num estudo feito no Egipto detectaram contaminação por DDT em amostras de leite de vaca, búfalo e cabra.

Os pesticidas organoclorados e seus metabólitos, quando entra no meio ambiente, persiste por períodos muito longo, e a sua presença constitui ameaça à biodiversidade e os seus efeitos nocivos em humanos, desde a desregulação do sistema endócrino até ao desenvolvimento de diversas patologias incluindo o cancro, daí a sua inclusão no grupo de compostos conhecidos por desreguladores endócrinos (Montes-Grajales e Olivero-Verbel, 2020).

### **2.1 Compostos desreguladores endócrinos**

O conceito de compostos desreguladores endócrinos (EDCs) é diversificado mas tem um ponto comum que os relaciona com as possíveis consequências no organismo (Rylander *et al.*, 2014; Costa *et al.*, 2015; Le Thi Minh *et al.*, 2016; Combarous, 2017). Também podem ser

definidos como substâncias que alteram as funções do sistema endócrino, e consequentemente, causam efeitos adversos à saúde da população e sua descendência (Giulivo *et al.*, 2016; Monneret, 2017). Por outro lado, a European Environment Agency (2019) define-os como agentes exógenos que interferem na regulação hormonal responsável pelo controlo de muitos processos de desenvolvimento do organismo e manutenção da homeostase.

Os autores Schug e colaboradores, (2011) definem os EDCs como substâncias químicas sintéticas incluindo alguma variedade de pesticidas e solventes que, quando absorvidas pelo organismo, podem bloquear as hormonas e perturbarem o funcionamento de certos órgãos do corpo.

Combinando os conceitos acima apresentados, pode-se definir os EDCs como compostos naturais ou sintéticos que podem alterar o funcionamento do sistema endócrino, causando impactos consideráveis na saúde de diversos organismos animais incluindo o homem. Fazem parte deste grupo, os fito estrogénios presentes em uma larga variedade de plantas, compostos orgânicos sintéticos como os bifenilos policlorados, bifenilos bromados, dioxinas, certos pesticidas, fungicidas, ftalatos, bifenóis e alquilfenóis (Hejji *et al*, 2020).

Os efeitos dos EDCs e os seus mecanismos de acção têm sido alvos de estudo com maior ênfase sobre os sistemas neurológicos e reprodutor, no qual têm sido relacionados com diversas patologias em fêmeas como o cancro do ovário, quistos em ovários e menopausa precoce. Em machos, alguns EDCs levam ao desenvolvimento de tumores dos testículos e da próstata, fraco crescimento dos órgãos sexuais e infertilidade (Hejji *et al*, 2020).

Segundo Schug e colaboradores (2011), dados epidemiológicos revelam uma tendência de um aumento dos distúrbios da função reprodutiva em humanos, os quais são relacionados com a presença dos EDCs em quantidades crescentes no meio ambiente, fenómeno evidenciado pelo aumento de casos de infertilidade.

Hejji e colaboradores (2020) em testes laboratoriais feitos em animais verificaram uma redução da qualidade do sémen, anormalidades do trato urogenital, incluindo hipospádia e criptorquidia em machos. A partir da exposição de indivíduos do sexo feminino aos EDCs

durante a gravidez, verificaram a sua associação com o cancro cérvico vaginal raro, diminuição da fertilidade, ocorrências de gravidezes ectópicas e menopausa precoce.

Admite-se que os EDCs podem reduzir ou bloquear a actividade de hormonas endógenas e causar impactos negativos significativos no desenvolvimento reprodutivo dos organismos, se estes forem expostos durante estágios críticos de desenvolvimento (Monneret, 2017).

Embora a sua influência directa na modificação dos genes em animais seja menos conhecida, alguns estudos feitos em animais revelam que os EDCs, para além de afectarem apenas o organismo exposto, os seus efeitos como mutações no DNA são também observados em seus descendentes (Schug *et al.*, 2011).

Para além dos efeitos acima mencionados, também são suspeitos de promoverem o desenvolvimento do cancro, síndrome testicular da disgenesia nos seres humanos, redução da quantidade e qualidade de espermatozóides e de testosterona (Roelofs *et al.*, 2014; Slama *et al.*, 2017).

Com o tempo, o número de casos de exposição aos EDCs tem aumentado em todo o mundo devido a dificuldades de evitar a exposição a estes compostos, isto aliado ao facto dessas substâncias serem muito diversificadas e não compartilharem qualquer semelhança estrutural, apesar de a maioria apresentar substituintes da família de halogénios, sendo os mais vulgares o cloro e bromo (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009).

## **2.2 Pesticidas**

Os pesticidas são substâncias naturais ou sintéticas capazes de destruir, repelir ou atenuar pragas, ou ainda substâncias reguladoras de plantas, desfolhantes, dessecantes ou estabilizadoras de nitrogénio (Trueblood *et al.*, 2016; Olutona e Livingstone, 2018).

Entende-se que os pesticidas sintéticos tenham sido expandidos no mundo e em especial até ao continente africano durante o período colonial, por volta das primeiras duas décadas do século vinte. Os seus efeitos tóxicos sobre o meio ambiente após as suas aplicações foram rapidamente observados (Shem, 2001). Apesar da sua toxicidade ambiental, o uso de pesticidas na protecção de culturas contra a acção das pragas de forma a promover a

produtividade, continua uma prática comum do sector agrário (Martínez-Lara e Páez Melo, 2017; Naidoo *et al.*, 2017; Thompson *et al.*, 2017; Raslan *et al.*, 2018). Muitas vezes, estes compostos têm sido usados de forma descontrolada e acima dos limites normais, isso aliado ao desafio crescente em aumentar a produtividade agrícola (Naidoo *et al.*, 2017). Todavia, os agricultores na maioria dos casos, não têm conhecimento das consequências que esta prática pode trazer ao ecossistema (Kariathi *et al.*, 2016).

O uso excessivo destes compostos pode resultar na sua acumulação e propagação ao longo da cadeia alimentar, transmitindo-se ao organismo humano por diversas vias tais como respiratória, oral e em alguns casos pela via cutânea (Martínez-Lara e Páez Melo, 2017; Olutona e Livingstone, 2018). Nos humanos e outros mamíferos podem fixar-se no leite e assim ingeridos pelos filhos durante a amamentação (Hayes *et al.*, 2006; Thompson *et al.*, 2017; Raslan *et al.*, 2018).

Algumas suspeitas relacionam as DNTs com as acções dos compostos químicos disponíveis no ambiente como os pesticidas, que globalmente são consideradas substâncias químicas com efeito de desregulação endócrino (Collotta *et al.*, 2013; Bornman *et al.*, 2017; Combarnous, 2017).

Os efeitos associados às exposições de certos pesticidas são vários do que se destacam o cancro, defeitos congénitos, doenças neuro degenerativas, cardiovascular, respiratórias, diabetes e renal crónica, desenvolvimento embrionário defeituoso, infertilidade, baixa produção hormonal e deformações esqueléticas (Collotta *et al.*, 2013; Grung *et al.*, 2015; Trueblood *et al.*, 2016; Monneret, 2017).

Nos últimos anos, tem-se registado aumento na taxa de mortalidade causada por doenças infecciosas não transmissíveis (DNTs) emergentes, que afectam grupos vulneráveis como mulheres, crianças e organismos aquáticos (Bornman *et al.*, 2017).

Apesar dos esforços de investigações relacionados com a compreensão das causas das DNTs, ainda subsistem lacunas de conhecimento sobre doenças relacionadas com a glândula endócrina juntamente com as doenças cardiovasculares, cancros, depressão e asma (Bornman *et al.*, 2017).

### **2.2.1 Contaminação e propagação dos pesticidas no ambiente**

A prevalência dos pesticidas no ambiente tornou-os um tema importante em trabalhos de pesquisas actuais, porque entram no meio ambiente por muitas vias, onde para além dos efeitos desejados, perturbam a vida dos organismos não alvos (Slama *et al.*, 2017).

Quando os pesticidas são aplicados podem acumular-se nas plantas, solo e nos sistemas hídricos, culminando numa degradação ambiental, alterações dos ecossistemas e prejuízos à saúde (Veiga *et al.*, 2006; Catarina e Dias, 2016).

Em sistemas hídricos dinâmicos como rios, quando a contaminação ocorre numa determinada área pode-se estender em toda a região adjuvante, como é o caso dos rios que correm em regiões poluídas por actividades agrícolas, com maior enfoque aos pesticidas (De Resende, 2002).

Actualmente, uma das variedades de pesticidas mais utilizados na agricultura são os da classe dos organofosforados, que possuem uma actividade insecticida muito eficiente, devido à sua capacidade de inibição da enzima acetilcolinesterase no sistema nervoso, que tanto actuam em insectos quanto em mamíferos (Veiga *et al.*, 2006).

Para além dos organofosforados, os piritróides constituem outra variedade de uso comum na actualidade. Contrariamente, outras classes como organoclorados que devido aos seus efeitos tóxicos, o Programa das Nações Unidas para o Ambiente, na convenção de Estocolmo, colocou na lista de compostos restritamente usados ou mesmo proibidos em muitos países a doze (12) pesticidas desta classe a saber: aldrin, chlordane, DDT, mirex, endrin, dieldrin, heptachlor, toxaphene, endosulfan, lindane,  $\alpha$ -HCH e  $\beta$ -HCH (Ali *et al.*, 2019). Contudo, estes compostos ainda continuam sendo detectados em amostras de diferentes ambientes incluindo produtos alimentares. Esta detecção pode estar relacionada com o uso excessivo destes poluentes nas décadas passadas, tendo levado à sua acumulação em diferentes meios, daí a sua detecção em amostras de sedimentos, peixes e vegetais (Ali *et al.*, 2019). A título de exemplo, em uma pesquisa feita por Nuapia *et al.* (2016) em amostras colhidas na África do Sul, detectaram aldrin, p,p'-DDT, p,p'-DDE, p,p'-DDE,  $\alpha$ -HCH,  $\beta$ -HCH no feijão, repolho, carne e peixe. No mesmo estudo, também detectaram aldrin em amostras de repolho, carne e peixe, dieldrin em amostras de feijão, carne e peixe, heptachlor em amostras de feijão e carne e o heptachlor epoxido em amostras de repolho e peixe.

## 2.2.2 Alguns pesticidas e compostos com efeitos de desregulação endócrina

### 2.2.2.1 Pesticidas organofosforados

Nas últimas décadas, o uso de pesticidas da classe de organofosforados (OP) aumentou significativamente devido à sua baixa persistência no ambiente (Capobiango e Cardeal, 2005). Contudo, estes compostos são bastante tóxicos para a maioria de animais vertebrados apesar da sua rápida degradação (Malhat e Nasr, 2011).

O profenofos ou O-(4-bromo-2-clorofenil), O-etil S-propilfosfotioato é um insecticida muito usado na agricultura, pertencente à classe dos OPs, o qual faz parte dos OPs atípicos por apresentar um grupo [S-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>] ligado ao átomo de fósforo, no lugar dos tradicionais grupos [O-CH<sub>3</sub> ou O-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>], cuja estrutura é apresentada na Figura 1 (Eddleston *et al.*, 2009).

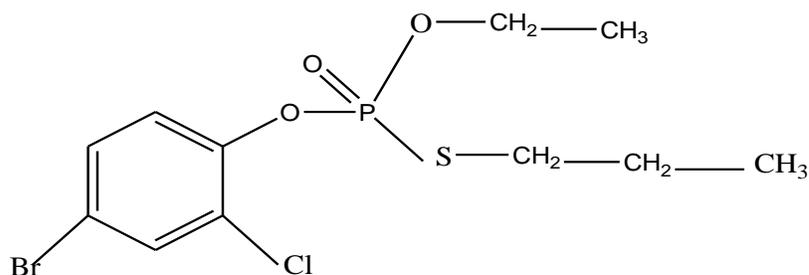


Figura 1. Fórmula estrutural do profenofos ou O-(4-bromo-2-clorofenil) O-etil S-propilfosfotioato

Profenofos é lipossolúvel e moderadamente tóxico quando comparado com outros organofosforados (Eddleston *et al.*, 2009). Por outro lado, certos estudos têm-o relacionado com a toxicidade de vários órgãos vitais como o fígado e o cérebro. A exposição a este insecticida pode causar lesão hepatocelular e alteração do metabolismo de aminoácidos. Em doses elevadas, pode induzir à vacuolização tecidual, hemorragia e hiperplasia das células Kupffer no fígado, inchaço das cápsulas de Bowman e degeneração tubular no rim (Mogda *et al.*, 2009).

A organização mundial da saúde (OMS) classifica o profenofos como insecticida moderadamente perigoso (classe de toxicidade II). Apresenta um nível moderado de toxicidade aguda após administração oral e dérmica, é extremamente tóxico em peixes e macroinvertebrados. Em geral, actua como inibidor da actividade da enzima

acetilcolinesterase, podendo estender a sua toxicidade para seres humanos (Abass *et al.*, 2007).

O profenofos faz parte dos insecticidas de utilização autorizada pelas suas propriedades como baixa persistência, mas a sua alta taxa de uso no controlo de pragas em culturas como algodão, milho e vegetais pode levar à contaminação de recursos hídricos e afectar negativamente os organismos aquáticos como peixe, e estender-se a todos os membros da cadeia trófica incluindo o homem (Sharafeldin *et al.*, 2015).

Sharafeldin e colaboradores (2015) expondo a tilápia do Nilo a profenofos, observaram que este insecticida influenciava na diminuição do conteúdo de glicogénio no fígado e no músculo e segundo estes autores, essa diminuição estaria relacionada com o bloqueio da transferência da glicose para as células, tendo por consequência a acumulação deste açúcar no sangue.

Para Sharafeldin e colaboradores (2015) a hiperglicemia pode estar relacionada com o estresse causado por este insecticida, que leva ao aumento da secreção de hormonas catecolaminas (glicogenólise) e corticosteróides (gliconeogénese). No mesmo estudo, observaram ainda uma redução nos níveis séricos de proteína, de globulina e do teor lipídico total no sangue, para além do aumento da albumina e da creatinina sérica, da uréia e do ácido úrico.

Pandey e colaboradores (2011) ao avaliarem o comportamento de peixes mediante exposição a profenofos, observaram anormalidades comportamentais como agitação, perda de equilíbrio, hiperactividade, formação de muco no corpo e nas guelras, levando ao esgotamento e morte. Para estes autores, as alterações comportamentais e a morte subsequente, são indicadores de que o efeito tóxico é mediado pela enzima nervosa e a sua perturbação afecta os sistemas respiratório e nervoso, paralisando todas as actividades vitais.

Na experiência feita por Abass e colaboradores (2007) baseada na avaliação do efeito de profenofos em microssomas do fígado de ratos e humanos, observou-se a acção inibidora de várias actividades microssómicas, indicando uma interacção considerável com as enzimas responsáveis.

Em outro estudo feito por Mogda e colaroradores (2009), após 28 dias da administração oral de profenofos em ratos, os resultados da análise das amostras do cérebro, fígado e soro destes

animais, demonstraram que o insecticida provocou em ratos um estresse oxidativo, alteração de alguns parâmetros bioquímicos como aumento da peroxidação lipídica e diminuição da  $\gamma$ -glutamil cisteinilglicina com maior efeito nas amostras de cérebro. Outros estudos feitos em anfíbios, comprovaram sua reurotoxicidade aguda, alterações morfológicas e histológicas. Para além destes, os seus efeitos na diminuição do metabolismo protéico em peixes são conhecidos, pois inibe as acções metabólicas enzimáticas em vários tecidos (Kushwaha *et al.*, 2016).

Segundo Kushwaha e colaboradores (2016), o profenofos é um desregulador endócrino (EDC), que tem demonstrado sua toxicidade sobre o sistema reprodutor masculino em ratos. Para além deste efeito, estes autores citam o estudo de Memon e colaboradores (2014), o qual comprovou a capacidade deste insecticida de induzir a ruptura de tecidos testiculares em coelhos e acredita-se que estes efeitos podem ser extensivos para os seres humanos.

#### **2.2.2.2 Pesticidas piretróides**

Os piretróides são pesticidas sintéticos derivados das piretrinas, obtidos das flores *de Chrysanthemum cinerariaefolium*, vulgarmente usados para fins industriais e agrícolas (Pimpão *et al.*, 2007; Ullah *et al.*, 2018). A sua utilização ganhou espaço no campo agrícola no controlo das pragas, na tentativa de substituir os organofosforados, organoclorados e carbamatos, devido à sua fácil biodegradação e considerados menos tóxicos a outras formas de vida não alvo, como mamíferos incluindo o homem (Pimpão *et al.*, 2007; Suvetha *et al.*, 2010).

Para além da agricultura, estes pesticidas têm sido usados em outras áreas de actividades como pecuária e no controlo de insectos ao nível doméstico (Imai *et al.*, 2014 e De Oliveira, 2019). Apesar das vantagens acima mencionadas, várias pesquisas relataram a presença dos seus resíduos em diferentes matrizes ambientais como água, organismos aquáticos (peixes) e produtos alimentares (carnes, ovos e leite). Esta acumulação tem sido associada à sua alta solubilidade em água (De Oliveira, 2019). Segundo Imai e colaboradores (2014), para além de produtos alimentares e organismos acima mencionados, a sua bioacumulação tem sido evidenciada pela detecção dos seus metabólitos em amostras da urina de seres humanos.

Estes compostos, à semelhança de outros pesticidas podem entrar no organismo humano por via de ingestão de vegetais, frutas, carnes e outros alimentos contaminados ou pela inalação do ar em ambientes onde foram aplicados. Embora as suas toxicidades agudas em mamíferos sejam consideradas baixas, crescem as preocupações sobre o conhecimento dos seus efeitos crónicos em humanos (Imai *et al.*, 2014). Diversos estudos citados por Imai e colaboradores (2014) revelam uma diminuição da espermatogénese em ratos e bodes administrados com alguns insecticidas piretróides, onde se sugere que essa diminuição esteja relacionada com a diminuição da biossíntese de testosterona. Por outro lado, Suvetha e colaboradores (2010) enfatizam que, de entre os animais aquáticos, os peixes constituem o grupo mais sensível aos piretróides devido aos seus efeitos neurotóxicos com doses letais na ordem de 10 a 1000 vezes mais baixas quando comparadas com as de mamíferos e aves.

Dos pesticidas mais usados desta classe, destaca-se a cipermetrina ou  $\alpha$ -cyano-3-fenoxibenzil-3-(2,2-dimetil-2,2-diclorovinil)-2,2-ciclopropano carboxilato, um insecticida sintético e classificado toxicologicamente na categoria II (moderadamente tóxico), e a sua fórmula estrutural é apresentada na Figura 2 a seguir:

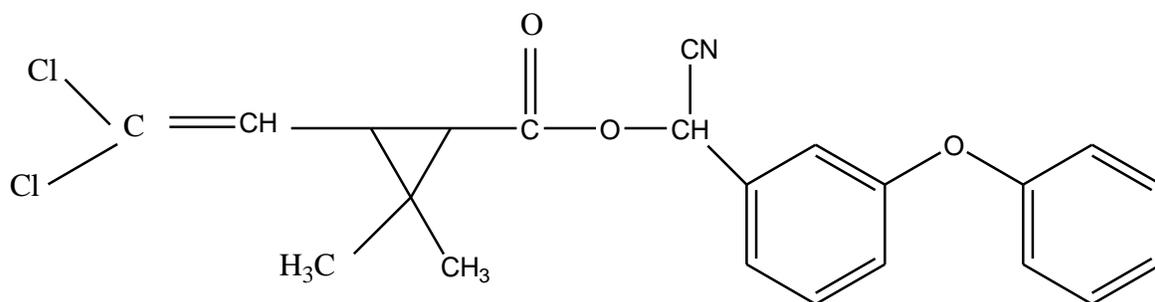


Figura 2. Fórmula estrutural da cipermetrina ou  $\alpha$ -cyano-3-fenoxibenzil-3-(2,2-dimetil 2-2-diclorovinil)-2,2-ciclopropano carboxilato

Este composto é usada na agricultura no controlo das pragas da cultura do algodão (*Heliothis armigera*) e na eliminação das larvas de mosquitos. A sua vasta utilização na agricultura faz com que resíduos deste insecticida se concentrem no meio aquático e em vários estudos relatam-se os seus impactos negativos sobre os peixes, como alterações hematológicas e histopatológicas, incluindo inibições enzimáticas (Suvetha *et al.*, 2010).

A cipermetrina em diferentes estudos referenciados por Bhanu, (2015), revelou uma toxicidade considerável em peixes, nos quais os autores reportam alterações de diferentes

parâmetros bioquímicos como: aumento das concentrações da glicose, da ureia e da creatinina no sangue, assim como a diminuição dos níveis de proteína, albumina e globulina.

Para o autor Bhanu (2015) o aumento da glicose e o estresse podem estar relacionados com a exposição dos peixes ao insecticida, que pode induzir a síntese de glicose a partir de proteínas do tecido hepático. O aumento do teor da ureia, associa-o às insuficiências renais e hepática, assim como à paragem cardíaca. Ainda este autor relaciona o aumento da creatinina com a extensa destruição muscular e insuficiência renal. A diminuição dos teores da albumina e globulina pode ser indicadora da redução da síntese proteica no fígado ou ainda pode estar relacionada com a disfunção hepática (Bhanu, 2015). Todavia, os resultados de estudos da toxicidade da cipermetrina em mamíferos são controversos. Segundo Muranli (2013) a cipermetrina é rapidamente metabolizado e quase 99% da quantidade absorvida no organismo é eliminada num intervalo de tempo muito curto. Mas, contrariamente a esta hipótese, há relatos do acúmulo da cipermetrina no tecido adiposo, cérebro e fígado em mamíferos (Hocine *et al.*, 2016).

Num estudo realizado por Hocine e colaboradores (2016), no qual a exposição de fêmeas de ratos prenhas a baixas doses de alfa-cipermetrina resultou em distúrbios metabólicos e estresse durante a gravidez, as mesmas anormalidades foram observadas em seus descendentes. Estes autores admitem que as alterações metabólicas do recém-nascido podem colocar em risco a sua saúde a longo prazo.

Muranli (2013) ao estudar os efeitos deste insecticida em amostras de linfócitos humano (glóbulos brancos) no ensaio *in-vitro* observou que a cipermetrina actuava como promotor da segregação cromossómica anormal e face a esta constatação, admite que pode inibir a progressão do ciclo celular durante a mitose, interferindo no fuso mitótico do aparato e dependendo do eixo do distúrbio parcial, pode ocorrer aneuploidia na célula da divisão subsequente.

Segundo Ullah e colaboradores (2018) uma exposição prolongada à cipermetrina pode conduzir a uma neurotoxicidade crónica e, em mulheres grávidas, pode afectar negativamente o processo reprodutivo resultando em aborto, uma vez que mesmo em doses baixas, afecta funções metabólicas, o que resulta em comprometimento da fisiologia materna e metabolismo do feto.

Em outro estudo conduzido por Montes (2020), dos insecticidas piretróides testados, a cipermetrina demonstrou uma maior afinidade com as proteínas promotoras do desenvolvimento do cancro da mama, fazendo parte dos compostos testados e considerados contaminantes com actividade estrogénica e que induzem uma proliferação significativa de células de cancro de mama.

Segundo Matisová e Hrouzková (2012), a União Europeia coloca a cipermetrina no grupo de pesticidas com efeitos de desregulação endócrino de segunda categoria ou pesticidas de toxicidade moderada. Contudo, à semelhança dos organofosforados, os peritróides constituem uma das variedades de uso comum na agricultura moderna. Contrariamente, outras classes como organoclorados que devido aos seus efeitos tóxicos, o Programa das Nações Unidas para o Ambiente, na convenção de Estocolmo colocou-os na lista de compostos restritamente usados ou mesmo proibidos em muitos países (Ali *et al.*, 2019).

Desta lista, são encontrados pesticidas organoclorados como DDT, lindane ( $\gamma$ -HCH) e seus homólogos  $\alpha$ -HCH e  $\beta$ -HCH, mas que ainda continuam sendo detectados em amostras de diferentes ambientes incluindo produtos alimentares (Ali *et al.*, 2019).

O diclorodifeniltricloroetano (DDT) incluindo os seus metabólitos e o hexaclorociclohexano (HCH), formam o grupo de pesticidas mais persistentes e lipofílicos, apresentam baixa taxa de degradação química e biológica. A sua capacidade de bioacumulação permite a sua migração no meio ambiente (água e ar) levando à contaminação de alimentos como vegetais e peixes e consequente exposição do consumidor (Odewale *et al.*, 2021).

### **2.2.2.3 Pesticidas organoclorados**

É um extenso grupo de pesticidas persistentes e considerados desreguladores endócrinos devido aos seus efeitos tóxicos que, de entre os vários problemas pode-se citar o nascimento de crianças de baixo peso, atraso no desenvolvimento neurológico e distúrbio da estrutura da hormona tireoidiano em recém-nascidos (Thieu, 2015). Neste grupo merecem destaque o p,p'-(diclorodifenil)-1,1,1-tricloroetano (DDT) e seus metabólitos, assim como as variedades do hexaclorobenzeno.

O DDT foi sintetizado pela primeira vez por Zeidler no ano de 1874 e o seu uso como insecticida foi promovido por Muller em 1946, tendo sido usado no controlo de carrapatos, mosquitos, pragas domésticas, na protecção de culturas durante o crescimento e após colheita (Shem, 2001; Thieu, 2015).

No passado, o DDT foi muito usado na agricultura devido à sua maior eficácia no controlo das pragas e ervas daninhas. Contudo, este composto e seus metabólitos fazem parte de poluentes orgânicos persistentes, com o tempo de meia-vida estimado acima de 30 anos. A sua maior persistência no ambiente tem resultado na sua acumulação ao longo da cadeia alimentar (Miao *et al.*, 2020).

Apesar de ter sido abolido no campo agrícola, o DDT ainda continua a ser detectado na forma dos seus metabólitos p,p'-DDE, p, p'-DDT e p, p'-DDD, onde todos eles apresentam alta persistência em solos e com tempos de meia-vida muito longo (Quim *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2013). No entanto, a presença destes compostos no meio ambiente, pode causar danos ambientais, que vão desde os animais selvagens até à saúde pública. Diversos estudos apontam o DDT como um tóxico reprodutivo com evidências crescentes dos seus efeitos adversos (Quim *et al.*, 2011). De entre os vários efeitos relacionados com a exposição deste insecticida, relatam-se alguns problemas como doenças hepáticas, distúrbios dos rins e danos do sistema nervoso, para além de diferentes tipos de cancro (Chen *et al.*, 2013).

Segundo Quim e colaboradores (2011), o DDT e seus metabólitos podem acumular-se no leite dos mamíferos, onde uma certa quantidade dos mesmos é transferida para as crias em amamentação ou através da placenta para o embrião em desenvolvimento ou para os ovos, no caso de aves e répteis, levando a danos teratogénicos ou reprodutivos.

A presença destes compostos no organismo humano tem sido apontada como uma das causas das alterações nos sistemas endócrino e reprodutivo (danos cromossómicos aos linfócitos humanos, redução dos níveis circulantes de estradiol e testosterona), para além de serem suspeitos como mutagénicos (Miao *et al.*, 2020).

Na Figura 3 é apresentada a fórmula estrutural do DDT (i) e do seu metabólito DDD (ii).

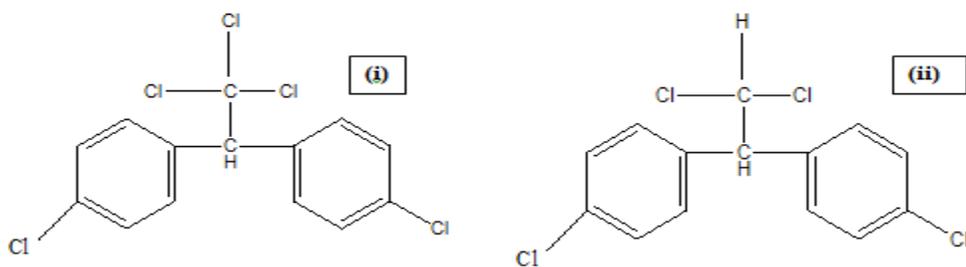


Figura 3. Fórmulas estruturais de p,p'-(diclorodifenil)-1,1,1-tricloroetano (i) e p,p'-(diclorodifenil)-1,1-dicloroetano (ii).

Outro organoclorado de maior interesse ambiental é o hexaclorociclobenzeno (HCH), um composto sintético, formado como produto da fotocloração do benzeno. Este composto pode ser encontrado sob a forma de oito isómeros, sendo os de maior interesse ambiental o  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , sendo este o de maior toxicidade e vulgarmente conhecido por lindane (Madaj *et al.*, 2018).

O lindane ( $\gamma$ -HCH) é um pesticida que encontra a sua utilização na protecção de culturas agrícolas e na saúde pública, com maior destaque nos países em desenvolvimento (Bano e Bhatt, 2007).

O  $\gamma$ -HCH em condições normais é um sólido branco, de cheiro ligeiro a bolor, não inflamável, pouco solúvel em água ( $0,0073 \text{ g.L}^{-1}$ ), bem solúvel em solventes orgânicos como etanol ( $6,4 \text{ g /100 g}$ ) e benzeno ( $28,9 \text{ g/100 g}$ ). Os outros dois isómeros:  $\alpha$  e  $\beta$  são gerados como subprodutos da síntese do lindane, mas com propriedades diferentes (Madaj *et al.*, 2018).

Devido à afinidade com o tecido gorduroso, a taxa de bio-transformação enzimática do  $\gamma$ -HCH no organismo é lenta, com maior tendência de bio acumular-se no cérebro (Bano e Bhatt, 2007; Nolan *et al.*, 2012). Para além de ser bio-acumulativo, a sua estabilidade química permite a sua migração a longas distâncias e causar uma contaminação generalizada, isto associado também ao seu período de meia-vida geralmente muito longo, estimado em cerca de 2 anos no solo e 6 anos no meio aquático (Zhang *et al.*, 2020).

Os seus resíduos no ambiente podem entrar na cadeia alimentar, onde são concentrados nos tecidos adiposos de seres humanos e animais, causando grandes riscos à saúde. Por isso, além de ser bio-acumulativo, é classificado como cancerinogénico, desregulador endócrino, mutagénico, genotóxico e teratogénico (Zhang *et al.*, 2020).

A presença de  $\gamma$ -HCH no organismo humano tem sido relacionada com certas perturbações de saúde e acredita-se que ele pode induzir o organismo a problemas como estresse oxidativo, fragilidades na barreira hematoencefálica, distúrbio na homeostase da glutatona e alteração na enzima monoxigenase cit P450, para além de alterar os fosfolipídios e a composição de ácidos gordos incluindo a actividade das enzimas AChE (Bano e Bhatt, 2007).

Por inalação, o  $\gamma$ -HCH é um veneno altamente imunotóxico e neurotóxico, leva à diminuição dos glóbulos brancos, promovendo oncogénese, mas também, em caso de intoxicação aguda, causa náusea, dor de cabeça e perda de consciência (Madaj *et al.*, 2018). Segundo Nolan e colaboradores (2012), uma exposição crónica ao  $\gamma$ -HCH em seres humanos, pode resultar em certos efeitos sistémicos graves, como depressão da função hepática, arritmias cardíacas e alteração do ciclo menstrual. Estes autores relatam estudos da toxicidade do lindane em recém-nascidos de mães expostas, os quais revelaram uma degeneração do músculo cardíaco, infiltração na gordura do fígado e necrose dos vasos do cérebro, pulmões e rins.

Em peixes, para além de ser neurotóxico, altera o seu comportamento, causando hiperexcitação, diminuição da qualidade do sangue e redução da actividade da enzima ATPase (Madaj *et al.*, 2018). Na Figura 4 é apresentada a fórmula estrutural do hexaclorociclobenzeno.

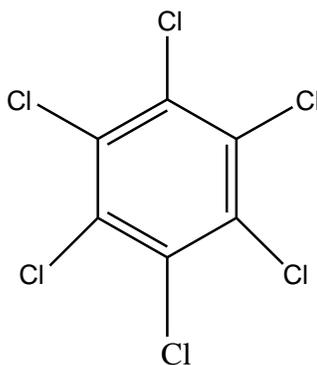


Figura 4. Fórmula estrutural do hexaclorociclobenzeno

### 2.3 Compostos desreguladores endócrinos emergentes

Para além dos pesticidas, outros compostos sintéticos como alquil fenóis têm sido apontados como membros do grupo dos desreguladores endócrinos. Os compostos orgânicos como etoxilatos de nonilfenol são mais usados no fabrico de sulfatantes, detergentes, tintas,

produtos de higiene pessoal, plásticos e pesticidas (Sayed *et al.*, 2012; Lyons e Benvenuti, 2016; Chadha *et al.*, 2018; Sharma *et al.*, 2021).

Uma parte destes compostos e seus resíduos são lançados no ambiente e a sua degradação leva à formação de compostos mais tóxicos como alquilfenóis (Sharma *et al.*, 2010; Chadha *et al.*, 2018; Sharma *et al.*, 2021). Os alquilfenóis (AF) são compostos orgânicos lipossolúveis, formados por um radical alquil ligado ao fenol. Constituem um dos grupos de poluentes orgânicos amplamente distribuídos no meio ambiente (Liu *et al.*, 2013).

Devido à sua lipossolubilidade, acumulam-se ao nível da cadeia trófica tornando-se tóxicos aos organismos vivos. A sua toxicidade e propriedades físico-químicas variam significativamente com a alteração da estrutura química, quer pela mudança da posição do radical alifático no anel aromático, ou pela variação do comprimento do radical (Liu *et al.*, 2013).

Segundo Chadha e colaboradores (2018), a toxicidade destes compostos depende também da sua hidrofobicidade e electrofilicidade, sendo a capacidade de absorção, adsorção e excreção nos tecidos relacionadas com a hidrofobicidade e a toxicidade aguda determinada por electrofilicidade.

Estes compostos têm demonstrado efeitos estrogénicos nos organismos animais, afectando as suas funções reprodutivas, daí que são classificados como desreguladores endócrinos (hormonas ambientais) também categorizados como estrogénios exógenos típicos. Os seus mecanismos de toxicidades genéticas, reprodutivas e comportamentais são muito complexos (Liu *et al.*, 2013).

Dos diferentes alquilfenóis, o 4-nonilfenol (4NP), o mais tóxico e abundante no ambiente, é listado na Lei de Controlo de Substâncias Tóxicas dos Estados Unidos (States EPA de 1996) como produto químico com suspeitas de efeitos desreguladores endócrinos (Sayed *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013); Chadha *et al.*, 2018).

O 4NP pode afectar o desenvolvimento da endometriose por interferir nas vias dependentes de estrogénio, uma vez que altera a função do estradiol pela ligação aos receptores de estrogénio  $\alpha$  e  $\beta$  (Sharma *et al.*, 2021).

Segundo Sharma e colaboradores (2021), o 4NP acumula-se no corpo de organismos animais e em diversas pesquisas, foi encontrado em diferentes tecidos humanos, como o tecido adiposo, leite materno e sangue em mulheres lactantes. Os mesmos autores, na sua pesquisa,

observaram que o 4NP causava infertilidade em ratos machos e alteração do início da puberdade e do ciclo menstrual em fêmeas pré-púberes.

Os autores Lyons e Benvenuti, (2016) em seu estudo afirmam que, quando os organismos aquáticos são expostos ao 4NP mostram sinais de feminização, defeitos congénitos e maiores taxas de mortalidade. Em humanos, os efeitos incluem perturbações do sistema imunológico, onde o 4NP também se pode ligar a células humanas não tumorais no estrogénio, causando proliferação ou morte celular (Lyons e Benvenuti, 2016). Estes autores ainda reportam uma ligação entre acções do 4NP e várias formas de cancro dependentes de hormonas como os cancros do ovário e da mama. Na Figura 5 é apresentada a fórmula estrutural do 4-nonilfenol

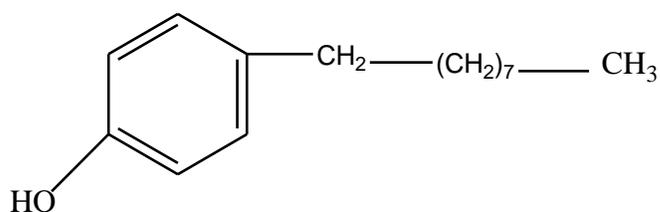


Figura 5. Fórmula estrutural de 4-nonilfenol

De uma forma geral, a detecção dos EDCs embora alguns estejam banidos no mercado, pode estar relacionada com o uso excessivo destes poluentes, registado nas décadas passadas, tendo levado à sua acumulação em diferentes meios como ar, solos e água, daí a sua detecção em amostras de sedimentos, peixes e vegetais (Lyons e Benvenuti, 2016).

Em resposta à problemática do uso contínuo de pesticidas com maior atenção na área agrícola, levou à criação de leis para regular o seu manuseamento e aplicações (Matisová e Hrouzková, 2012). Em Moçambique ainda não existe uma lei que regula os limites destes compostos em produtos alimentares. Entretanto, certos países e organismos internacionais fixam limites máximos residuais (MRLs) para o controlo da qualidade de alimentos nestes parâmetros.

Na Tabela 1 a seguir são apresentados os limites máximos residuais (MRLs) dos insecticidas DDT e seus metabólitos, profenofos e cipermetrina em produtos vegetais e peixes fixados nas diferentes legislações.

Tabela 1. MRLs permitidos para diferentes EDCs nas matrizes de vegetais e peixes

Insecticida	MRLs (mg.kg <sup>-1</sup> ) por matriz		Legislação	Fonte
	Vegetal	Peixe		
Cipermetrina	0,1– 0,5	–	RSA	Quim <i>et al.</i> , (2011)
	1			Codex (2009)
DDT	0,05		UE	Odewale <i>et al.</i> , (2021)
		0,2	FAO/WHO	Thompson <i>et al.</i> (2017)
DDD	0,05	–	UE	Odewael <i>et al.</i> , (2021)
β-HCH	1,0	–	RSA	Quim <i>et al.</i> , (2011)
γ-HCH	1,0		RSA	Quim <i>et al.</i> , (2011)
		0,01		Codex Database
Profenofos	0,5 – 1,0	–	RSA	Quim <i>et al.</i> , (2011)
4-Nonilfenol	–	–	–	–

RSA- República Sul Africana; UE- União Europeia

Segundo Veiga e colaboradores (2006) e Sultan e colaboradores (2013), a organização mundial da saúde (OMS) estima que ocorram cerca de três milhões de intoxicações agudas por pesticidas anualmente no mundo, provocando um total aproximado de 220 mil mortes.

Assim, a sua determinação e quantificação em alimentos tornou-se uma necessidade e estudos de desenvolvimento de métodos para a sua extracção em diversas matrizes alimentares constituem um desafio por parte de investigadores. Neste âmbito, as matrizes de maior interesse são os vegetais e organismos aquáticos por constituírem os mais afectados por estes contaminantes.

## **2.4 Grupo de alimentos de origem vegetais e animal alvo de contaminação por EDCs**

Existem várias espécies vegetais mais consumidas no mundo, sendo as mais vulneráveis à contaminação as da classe das hortícolas cultivadas. Algumas das espécies pela sua vulnerabilidade ao ataque das pragas, torna-se indispensável a administração de pesticidas para sua protecção. Para além das plantas, os organismos aquáticos também constituem alvos acidentais, uma vez que intensas actividades agrícolas têm sido verificadas junto dos cursos de água como rios e lagoas. Assim, o repolho, a couve e em particular os peixes de água doce, têm-se tornado fontes primária de contaminação alimentar nas cadeias tróficas, devido à sua maior disponibilidade e preferência por parte dos consumidores.

### **2.4.1 Culturas de repolho e couve**

O repolho e couve são vegetais denominados *Brassica oleracea L.*, são nativas da região Mediterrânea e constituem um grupo de espécies mais cultivadas em diferentes partes do mundo. O seu desenvolvimento depende das condições climatéricas e do solo, a cultura do repolho cresce facilmente em regiões de clima frio e solos húmidos (Ferreres *et al.*, 2007; Ordás e Cartea, 2007).

Embora a cultura do repolho seja mais difundida relativamente à da couve, ambas apresentam várias características semelhantes, razão pela qual recebem a mesma classificação taxonómica diferindo apenas na espécie. Pertencem ao reino-plantae, classe-mognoliopsida, família-brassicacea e espécie-*Brassica oleracea L* (Ordás e Cartea, 2007).

Os vegetais do género *Brassica*, particularmente a couve e o repolho, ganharam espaço na dieta de várias comunidades por possuírem várias propriedades benéficas à saúde do consumidor, isto é, apresentam baixo teor de gordura e proteínas, altos teores de fibras, de minerais e de compostos fenólicos (Taveira *et al.*, 2009 e Cartea *et al.*, 2011). No entanto, Sousa e colaboradores, (2005) acrescentam que, para além dos compostos apresentados, a couve contém ainda vitamina E, uma variedade de vitaminas do complexo B, carotenos e ácido ascórbico.

Para além das vantagens acima mencionadas, os vegetais do género *Brassica*, com mais destaque para o repolho contêm certos metabólitos com propriedades antioxidantes e anti-

inflamatórias (Sousa *et al.*, 2005; Ferreres *et al.*, 2007; Sousa *et al.*, 2008; Cartea *et al.*, 2011). Também acredita-se que o consumo destes vegetais reduz o risco de desenvolvimento de cancro (Sousa *et al.*, 2005; Sousa *et al.*, 2008; Cartea *et al.*, 2011).

Taveira e colaboradores, (2009) citam diferentes estudos que reportam o uso de compostos fenólicos na prevenção de doenças crónicas como cancro, aterosclerose, nefrite, diabetes mellitus, reumatismo, e doenças cardiovasculares, compostos estes contidos em legumes do género Brassica.

O consumo de alimentos de origem vegetal em Moçambique tem aumentado significativamente, fazendo parte da dieta da população incluindo a dos maiores centros urbanos, constituindo um dos alimentos básicos na segurança alimentar e nutricional da população (Haber *et al.*, 2015).

Segundo Haber e colaboradores (2015) esta nova dinâmica pode ser explicada pelos esforços que o governo de Moçambique tem exercido na criação e promoção de políticas de incentivos à produção e produtividade agrícolas, aliado ao conhecimento por parte da população, dos benefícios nutricionais que estes alimentos oferecem.

A produção de hortícolas no país é mais centrada em pequenos agricultores e o comércio destes produtos ainda é quase informal, com crescimento limitado pela dificuldade ou quase falta de investimentos de uma forma coordenada e integrada para o desenvolvimento de todos os elos da cadeia (Haber *et al.*, 2015).

De uma forma geral, a horticultura é praticada nas margens dos rios, lagoas e em regadios, com recurso a instrumentos rudimentares, não obstante o uso de certas tecnologias modernas de produção como a irrigação, adubação e uso de pesticidas com vista ao melhoramento da produção e produtividade. Por isso, o uso sustentável dos recursos naturais e preservação do meio ambiente são recomendáveis. Das culturas produzidas, merece destacar o repolho e a couve pelo facto de serem os mais difundidos e consumidos.

## **Repolho**

O repolho ou *Brassica oleracea* L. var. *capitata* (Figura 6) é um vegetal pertencente à família Brassicaceae, apresenta folhas arredondadas e cerosas. No repolho encontram-se folhas

externas e internas, estas últimas sobrepostas umas às outras, formando uma cabeça compacta e um caule curto sem ramificações (Haber *et al.*, 2015). Esta planta desenvolve-se melhor nas regiões de clima frio e temperaturas amenas, podendo variar entre 15° e 25 °C (Ferrerres *et al.*, 2007; Haber *et al.*, 2015), mas certas variedades adaptam-se às regiões tropicais como Moçambique onde as temperaturas são elevadas (Haber *et al.*, 2015).



**Classificação taxonómica** (Ordás e Cartea, 2007)

Reino: plantae;

Classe: magnoliopsida;

Família: brassicacea

Género: *Brassica oleracea* L

Espécie: *Var. capitata*

Figura 6. Repolho e sua classificação taxonómica

### **Couve**

A couve de folha ou *Brassica oleracea* var. *acephala* (Figura 7) é uma das hortícolas mais cultivadas e consumidas em Moçambique. Uma planta que difere do repolho por não formar cabeça e as suas folhas apresentam limbo bem desenvolvido, com pecíolo longo e nervuras bem destacadas (Haber *et al.*, 2015).

De acordo com Pereira e colaboradores (2016), a couve é muito rica em nutrientes, especialmente cálcio, ferro, vitaminas A, C, K e B5, é boa fonte de carotenóides de entre as hortaliças, com maiores concentrações de luteína e beta caroteno, cujo o consumo pode reduzir os riscos de cancro do pulmão e de doenças oftalmológicas.



**Classificação taxonómica** (Ordás e Cartea, 2007; Embrapa, 2015)

Reino: plantae;

Classe: magnoliopsida;

Família: brassicacea

Género: *Brassica oleracea* L

Espécie: *Var. acephala*

Figura 7. Couve e sua classificação taxonómica

De uma forma geral, a produção destas hortícolas principalmente na tendência comercial, é normalmente feita recorrendo-se à migração para técnicas de agricultura moderna, desde a preparação e correcção do solo, adubações orgânica e química até ao uso de pesticidas no controlo de pragas e doenças.

Para além das hortícolas, o peixe faz parte dos alimentos de maior preferência na dieta da população Moçambicana. Das diversas espécies de peixe merecem atenção a tilápia e o peixe-gato, por serem espécies mais vulgares, que ocorrem em rios, lagos e lagoas, ambientes mais vulneráveis à contaminação por pesticidas e outros compostos ambientalmente perigosos.

#### **2.4.2 Peixes de água doce**

Existem variedades de espécies de peixe de água doce sendo a tilápia e o peixe-gato as mais vulgares, onde em Moçambique particularmente, elas constituem as espécies de maior abundância, sendo deste modo as mais consumidas.

#### **Peixe tilápia**

As tilápias são peixes da água doce que pertencem à família Cichlidae, que melhor se desenvolvem nas regiões tropicais e subtropicais (Canonico *et al.*, 2005; Kamal e Mair, 2005; Maddern *et al.*, 2007). Segundo Maddern e colaboradores (2007), estes peixes tiveram a sua

origem na África e sudoeste asiático na região do Médio Oriente. São caracterizadas por uma facilidade de adaptação à variação das condições ambientais como temperatura e salinidade, embora a tolerância à variação da salinidade dependa de espécie para espécie (Canonico *et al.*, 2005; Kamal e Maira, 2005). Estas características fazem com que a tilápia seja um dos organismos aquáticos mais difundido no mundo (Costa-Pierce, 2003).

As tilápias são também consideradas "frango aquático", este termo deriva do facto de serem uma fonte de proteína acessível e de alto rendimento. As necessidades alimentares com base neste peixe levaram à sua multiplicação a partir da criação em cativeiro (aquacultura), onde em vários países particularmente na Ásia, as tilápias produzidas são totalmente consumidas no mercado interno, contribuindo para a segurança alimentar da sociedade (Canonico *et al.*, 2005).

Existem muitas variedades de espécies da tilápia no mundo, sendo as mais difundidas o *Oreochromis niloticus* ou tilápia do Nilo e o *Oreochromis mossambicus* ou moedor da boca, também conhecida por tilápia de Moçambique (Maddern *et al.*, 2007).

O *Oreochromis mossambicus* faz parte dos peixes considerados de origem africana, os chamados tilápias que, juntamente com outros representantes, foram propagados para fora da África (Firmat *et al.*, 2016). Entende-se que esta variedade seja nativa dos rios do leste da África Central e as investigações científicas admitem que, partindo desta região, foi espalhada para outros lugares do planeta, para fins de criação e controlo de pragas como ervas daninhas aquáticas e insectos que interferiam no desenvolvimento da piscicultura e da pesca. Em Moçambique, é encontrada em quase todos os rios, com maior abundância nas regiões próximas da costa (Costa-Pierce, 2003).

A sobrevivência da *Oreochromis mossambicus* é facilitada pela sua dieta, um omnívoro que geralmente se alimenta de algas filamentosas, fitoplâncton, detritos e organismos bentónicos. Outra razão que permite a sua maior abundância apesar de ter um ciclo reprodutivo prolongado, é a capacidade que tem sobre o controlo dos ovos fertilizados e dos recém-nascidos, o que reduz o risco de predação (Maddern *et al.*, 2007). A tilápia de Moçambique está representada na Figura 8.



Figura 8. *Oreochromis mossambicus* (Tilápia de Moçambique)

### **Peixe-gato**

O peixe-gato ou *Clarias gariepinus* (Figura 9) é uma das espécies de peixes característica da região africana, um omnívoro (que se alimenta de carne e vegetais) e constitui um importante recurso em todo mundo (Omitoyin *et al.*, 2006). Encontra-se mais difundido no mundo, isso associado à sua fácil adaptação às variações das temperaturas, sua resistência e tolerância a más condições sanitárias da água (Ejere *et al.*, 2014). Segundo El-Husseiny e colaboradores (2018), de entre outros factores que permitem a sua larga difusão, destacam o seu fácil crescimento em regiões dos climas tropicais e subtropicais, a sua resistência a doenças e a alta fecundidade.



Figura 10. Imagem da *Clarias gariepinus*

## **2.5 Determinação de pesticidas em amostras de alimentos**

O teor de pesticidas em alimentos pode ser determinado usando-se os métodos cromatográficos como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a cromatografia gasosa (GC) acoplados ao espectrofotômetro de massa. O uso de detectores de massa oferece uma vantagem pois possibilita a identificação e a detecção de pesticidas mesmo em concentrações traço (Silvina *et al.*, 2013)

### **2.5.1 Métodos cromatográficos**

A cromatografia pode ser entendida como um conjunto de técnicas que visam à separação, identificação e quantificação dos componentes de uma mistura complexa, com base na diferença da distribuição desses componentes entre duas fases diferentes, uma estacionária com uma grande superfície de contacto e uma fase móvel em contacto com a estacionária (Modern practice of gas chromatography, 2005).

#### **2.5.1.1 Mecanismos de separação dos componentes de uma mistura em cromatografia**

A mistura em análise pode ser gasosa, líquida ou sólida, sendo necessário que os componentes da amostra sejam estáveis (devem ter uma pressão de vapor de aproximadamente 0,1 Torr na

temperatura de operação) e possam interagir com a fase estacionária, isto é, com o material da coluna (adsorvente sólido ou líquido) e a fase móvel líquida ou gás de arraste (Grob e Barry, 2005).

Como resultado dessa interação, haverá uma distribuição diferente dos componentes da amostra entre as duas fases, resultando na sua separação em zonas sob a forma de picos ou bandas (Grob e Barry, 2005).

Na Figura 10 a seguir, apresenta-se um cromatograma de cinco componentes de uma mistura, separados em uma técnica de cromatografia em coluna.

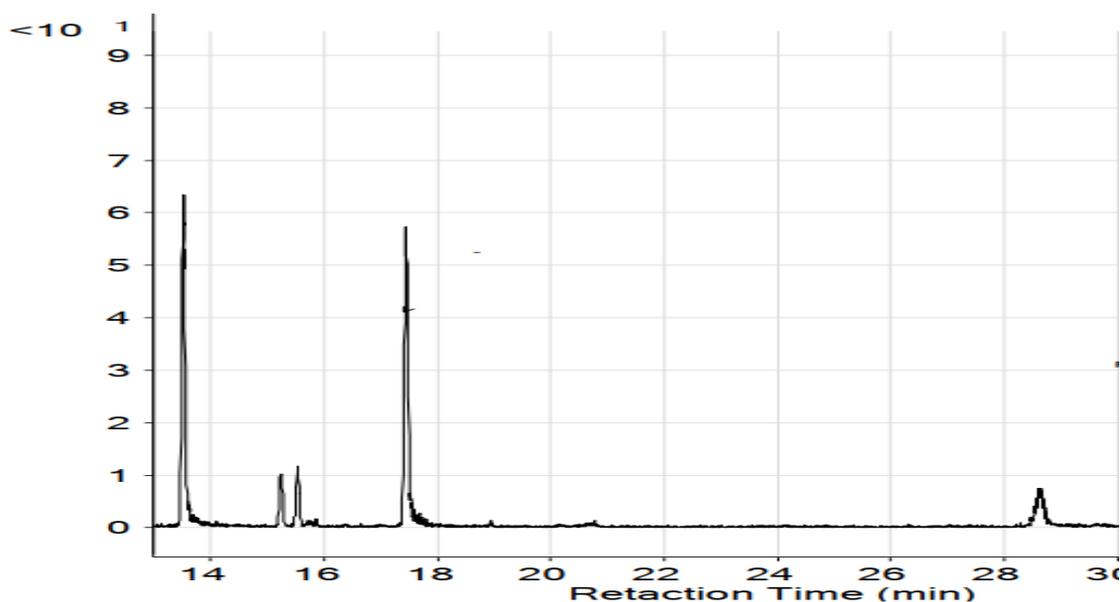


Figura 11. Exemplo de um cromatograma de separação de cinco componentes em mistura

Das técnicas cromatográficas, uma das mais usadas é a cromatografia gasosa devido à sua sensibilidade e facilidade de adaptação.

### 2.5.2 Cromatografia gasosa

A cromatografia gasosa (GC) é uma técnica versátil que inicialmente foi desenvolvida para análise apenas de misturas gasosas. Hoje em dia, foi adaptada de forma a incluir a separação e análise de amostras líquidas de componentes voláteis. Em caso de componentes não voláteis,

pode recorrer-se a técnicas de derivatização ou pirólise de forma a aumentar a volatilidade dos componentes (Bhardwaj *et al.*, 2016).

Para melhorar a sua eficiência na identificação é acoplado a um espectrómetro de massa, o qual usa uma impressão digital comparativa (programa) para identificação de picos no cromatograma (Bhardwaj *et al.*, 2016). A vantagem do uso do detector de massa é que ele é ajustável para qualquer espécie química e apresenta um baixo limite de detecção na ordem de 0.25 a 100 pg (Skoog *et al.*, 1998).

Contrariamente a outros tipos da cromatografia, em GC a fase móvel é um gás inerte que não interage com as moléculas dos anólitos, mas sim, actua como meio de transporte destes através da coluna (Skoog *et al.*, 1998; Bhardwaj *et al.*, 2016). Dentre os diferentes gases, o hélio é o mais usado, embora o argon, o nitrogénio e o hidrogénio também encontram as suas aplicações (Skoog *et al.*, 1998). Desta forma, a separação do anólito em GC depende da sua afinidade com a fase estacionária e que quanto maior for a sua solubilidade ou interacção com esta fase, ele será mais retido pela coluna e maior será o tempo para sua detecção (Bhardwaj *et al.*, 2016)

Para além da interacção coluna-anólito, outro factor que influencia significativamente na separação é a temperatura, uma vez que esta afecta a volatilidade dos anólitos. Para facilitar o controlo da temperatura, a coluna de separação (fase estacionária) deve ser colocada em um forno controlado termostaticamente. Na Figura 11 é apresentado um esquema de funcionamento de um sistema de análise em cromatografia gasosa.

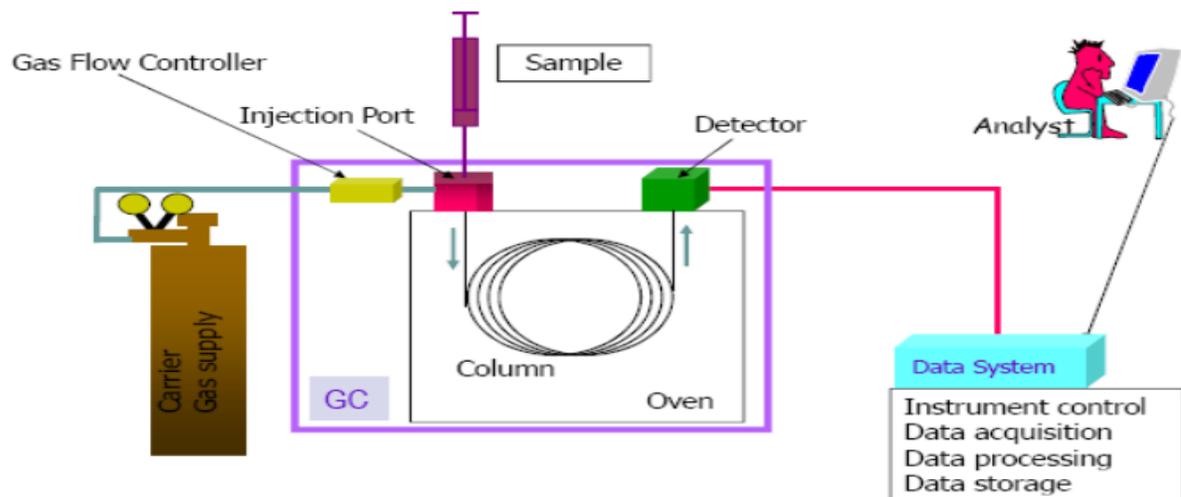


Figura 121. Diagrama de um sistema de cromatografia gasosa

Fonte: Bhardwaj e colaboradores (2016)

### 2.5.2.1 Análises quantitativas em cromatografia

O método mais directo para análises quantitativas em cromatografia envolve a preparação de uma série de soluções de padrão externo que tenham uma composição próxima à da amostra. A partir da integração dos picos dos padrões, traça-se uma curva de calibração a partir das alturas ou áreas dos picos em função da variação das concentrações do padrão (Skoog *et al.*, 1998).

A análise quantitativa pode ser negativamente afectada por certos factores como a incerteza na medição do volume da amostra, ocasionalmente, a taxa de injeção também é um factor com efeito significativo sobre o resultado. As amostras são geralmente injectadas em pequenos volumes (aproximadamente 1  $\mu\text{L}$ ), e as incertezas associadas às medições destes pequenos volumes são significativas (Skoog *et al.*, 1998).

Para controlar estes erros Skoog e colaboradores (1998), recomendam o uso das áreas em detrimento das alturas dos picos em análises quantitativas, embora as alturas dos picos sejam medidas facilmente e com maior precisão, mas as áreas oferecem a vantagem de serem menos afectadas pela taxa de injeção. Por outro lado, as alturas dos picos são afectadas pelas mudanças dos tempos de retenção ou eficiência da coluna o que não acontece de forma significativa com as áreas.

Para melhorar a qualidade dos resultados em cromatografia gasosa, o uso de padrões internos tem sido recomendado porque estes ajudam na correcção das incertezas introduzidas pela injeção de amostras. Neste procedimento, deve ser adicionada cuidadosamente uma quantidade conhecida do padrão interno em cada padrão e amostras. A proporção das áreas ou alturas dos picos do anólito nos padrões e nas amostras com os do padrão interno serve como a variável analítica (Skoog *et al.*, 1998). Segundo estes autores, para se alcançar melhores resultados, o pico do padrão interno deve ser bem resolvido em relação aos picos de todos os outros componentes da matriz, por outro lado, o pico do padrão interno deve aparecer nas proximidades do pico do anólito.

Para a análise de pesticidas em técnicas cromatográficas é necessária a extracção dos anólitos na amostra, mas as técnicas actualmente disponíveis apresentam um inconveniente de altos custos na aquisição de equipamentos (Meira, 2015) e etapas de extracção muito complexas (Carneiro *et al.*, 2013), factor limitante na investigação e trabalhos de controlo da qualidade de alimentos. Para superar estes constrangimentos houve a necessidade de se desenvolver técnicas de extracção mais acessíveis e eficientes vulgarmente conhecidas por *Quickly, Effective, Cheap, Easy, Rugged and Safety* método, que significa “rápido, efectivo, barato, simples, robusto e seguro”.

### **2.5.3 Método de QuEChERS**

Durante a última década, na determinação de pesticidas em diferentes matrizes de alimentos tem sido usado o método QuEChERS modificado com aceitável recuperação (De Oliveira, 2019).

A complexidade da composição dos alimentos ocasiona dificuldades para a determinação de pesticidas e outros compostos orgânicos, tornando-se necessária a etapa de limpeza do extracto após extracção com solvente (Meira, 2015). A etapa de limpeza é essencial para promover a robustez e confiabilidade aos resultados obtidos pelo sistema cromatográfico, uma vez que componentes não-voláteis da matriz, podem ficar aderidos ao sistema de injeção e também na coluna cromatográfica, danificando a coluna e afectar a resposta do sistema. Isto

traz por consequência um aumento da frequência de manutenções técnicas do equipamento (Prestes *et al.*, 2011; Meira, 2015; De Oliveira, 2019).

A outra vantagem que a técnica oferece é o uso de quantidades reduzidas de amostra e pouco volume de solvente, quando comparada com os métodos convencionais (Meira, 2015). Segundo Hejji (2020), diferentes técnicas de extração em fase sólida dispersiva, método QuEChERS e hidrólise ácida têm sido usadas em várias pesquisas na extração dos pesticidas em vegetais e frutas.

Em todas elas, registam-se três etapas principais: extração com solvente, sendo o acetonitrilo o mais usado, partição promovida pela adição de sais como sulfato de magnésio ( $MgSO_4$ ) ou de sódio ( $Na_2SO_4$ ) e cloreto de sódio ( $NaCl$ ), seguida da limpeza do extracto usando um adsorvente sólido, composto por amina primária secundária (PSA) (Prestes *et al.*, 2011; Carneiro *et al.*, 2013; Boes *et al.*, 2015; Martínez-Lara e Páez Melo, 2017).

Na optimização do método QuEChERS para determinação de pesticidas e outros compostos orgânicos, Martínez-Lara e Páez-Melo, (2017) verificaram que a extração é fortemente influenciada pelas quantidades dos sais de partição ( $MgSO_4$  ou  $Na_2SO_4$  e  $NaCl$ ). A combinação  $MgSO_4/NaCl$  na proporção 4:1 tem sido a mais frequente na maioria das extrações (Rejczak e Tuzimski, 2015).

No passado, os métodos de extração de pesticidas eram baseados no uso de solventes orgânicos, seguido da diluição com água e partição em solventes não polares, diminuindo a possibilidade de extrair efectivamente compostos polares (Boes *et al.*, 2015).

Contrariamente, hoje em dia, emprega-se mais acetonitrilo como solvente que possibilita a extração de uma variedade de pesticidas com diferentes polaridades e a sua versatilidade de ser usado nas análises tanto em HPLC-MS assim como em GC-MS (Prestes *et al.*, 2011).

De acordo com Prestes e colaboradores (2011), a outra vantagem do método “QuEChERS” é que a agitação pode ser feita manualmente ou por vortex, que possui várias vantagens em relação à agitação mecânica. A outra vantagem é que a extração ocorre em um único frasco fechado evitando a exposição do analista e a rapidez, uma vez que não há necessidade de lavagem do homogeneizador no intervalo entre as extrações.

Uma outra vantagem é a sua eficiência em várias matrizes incluindo de vegetais e animais (Omar *et al.*, 2013; Martínez-Lara e Páez Melo, 2017) para além da flexibilidade e facilidade da sua modificação (Martínez-Lara e Páez Melo, 2017).

Segundo De Oliveira (2019) existem vários adsorventes como o octadecil ligado (C18) a amina primária secundária ligada à sílica (PSA) que são empregues na etapa de limpeza do extracto, mas a desvantagem do seu uso, prende-se com o seu alto custo no mercado. Assim, como alternativa aos adsorventes tradicionais, certos materiais de baixo custo pode ser testados para avaliar a sua eficiência na limpeza dos extractos, onde a proteína das sementes da moringa uma delas. Em estudos feitos por Okuda e colaboradores (2001) e Madrona e colaboradores (2011), as sementes da moringa demonstraram as suas potencialidades como adsorvente no tratamento da água para o consumo e na purificação de águas residuais das indústrias.

## **2.6 Cultura da moringa**

A *Moringa oleífera* (MO) simplesmente conhecida por moringa é uma planta tropical da família Moringaceae, caracterizada pela sua facilidade de adaptação a diferentes tipos de solos e tolerância a climas secos. Por essa razão é actualmente cultivada em vários países do mundo (Okuda *et al.*, 2001; Madrona *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2016). Segundo Araújo-Leonídio e colaboradores (2019), a moringa é a única família de arbustos com 14 espécies conhecidas, sendo a mais abundante a *Moringa oleíferas Lam* (sin. *Moringa pterygosperma*), que é uma planta nativa do noroeste da Índia e acredita-se que a partir desta região, tenha sido distribuída para diferentes lugares do planeta.

Diferentes partes desta planta têm sido usadas para vários fins, com maior destaque para as suas sementes por apresentarem maior capacidade adsorvente, a qual pode estar associada à acção das proteínas nelas presentes. As sementes da moringa contêm quatro proteínas a saber: Mo-CBP3-1, Mo-CBP3-2, Mo-CBP3-3 e Mo-CBP3-4, todas são isoformas da proteína 2S-Albumina, que lhes confere características coagulantes (Freire *et al.*, 2015; Costa *et al.*, 2016).

De acordo com Costa e colaboradores (2016), todas as quatro proteínas apresentam peso molecular inferior a 14kDa, ponto isoelétrico entre pH 10 e 11, resistência térmica até 100 °C, duas cadeias  $\alpha$ -helicoidais proteoliticamente processadas e estabilizadas por quatro pontes de

sulfeto. Na Figura 12 são apresentadas as imagens da *Moringa oleífera* (i), das sementes (ii) e proteína da moringa (iii).



Figura 13. Imagem ilustrativa da *Moringa oleífera* (i), das suas sementes (ii) e da proteína das sementes (iii)

### 2.7 Validação de um método analítico

Para a aceitabilidade de um novo método analítico ou da funcionalidade de uma certa alteração em um método pré-usado, é necessário que o novo método seja comprovado e aprovado por um processo técnico-analítico chamado validação.

A validação pode ser definida como uma demonstração por evidências objectivas, que um determinado método proposto apresenta requisitos para aplicações analíticas, e assegura a

confiabilidade dos resultados (Ribani *et al.*, 2004). Neste processo são essenciais os seguintes parâmetros: especificidade/selectividade, a linearidade, os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ), a exactidão, a precisão e a robustez (Ribani *et al.*, 2004; Bhardwaj *et al.*, 2016).

### **2.7.1 Especificidade ou selectividade**

Este parâmetro demonstra a capacidade do método em detectar o sinal do anólito em uma mistura complexa sem interferência (Ribani *et al.*, 2004; Płonka *et al.*, 2016). Também pode ser usado para avaliar o grau de interferência de espécies activas como co-extractos e outras impurezas, assim como produtos de degradação e outros compostos de propriedades similares que possam estar presentes na matriz (Ribani *et al.*, 2004).

### **2.7.2 Linearidade**

É a capacidade do método em fornecer resultados (sinais) directamente proporcionais à concentração do anólito dentro da faixa de calibração ou zona do trabalho (Ribani *et al.*, 2004; Bhardwaj *et al.*, 2016; Tripathy *et al.*, 2016).

Essa relação, muitas das vezes, é expressa através de uma equação de recta chamada de curva analítica ou curva de calibração. A sua avaliação pode ser feita a partir do coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ) e considera-se que, se o valor de  $R^2 > 0,999$  evidencia um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão, mas também são aceites valores acima de 0.90 (Ribani *et al.*, 2004).

### **2.7.3 Limite de detecção (LOD)**

Pode ser entendido como a menor concentração do anólito que pode ser detectada mas não quantificada nas condições experimentais estabelecidas. Pode ser determinado mediante o sinal/ruído para casos em que o método apresenta linha de base ou por métodos estatísticos (Brito *et al.*, 2003 e Ribani *et al.*, 2004). Este parâmetro pode ser determinado a partir da equação 1 (Brito *et al.*, 2003).

$$\text{LOD} = \frac{3 \cdot Sp}{m} \quad (1)$$

Onde “sp” é o desvio padrão do sinal/ruído e “m” o declive da recta ou curva de calibração.

#### 2.7.4 Limite de quantificação (LOQ)

É definido como a menor concentração do anólito que pode ser quantificada na amostra, com exactidão e precisão aceitáveis a um certo nível de confiança, sob as condições experimentais adoptadas (Brito *et al.*, 2003). Pode ser determinado mediante o sinal/ruído para casos em que o método apresenta linha de base ou por métodos estatísticos. Normalmente é estimado pela equação 2.

$$\text{LOQ} = \frac{10 \cdot Sp}{m} \quad (2)$$

Segundo Ribani *et al.* (2004) e Płonka *et al.* (2016) para o cálculo dos LOD e LOQ, recomendam o uso dos parâmetros da curva analítica, porque segundo Ribani *et al.* (2004), a curva é estatisticamente mais confiável. Neste método os LOD e LOQ podem ser estimados usando-se as equações 3 e 4, respectivamente.

$$\text{LOD} = \frac{3.3 \cdot Sy/x}{m} \quad (3)$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \cdot Sy/x}{m} \quad (4)$$

onde:  $s_{y/x}$  – desvio padrão residual da linha de regressão

#### 2.7.5 Precisão de um método analítico

É definida como o grau de aproximação entre várias medidas efectuadas na mesma amostra (Brito *et al.*, 2003; Ribani *et al.*, 2004). Este teste é feito a partir de amostras fortificadas pelo padrão em uma concentração conhecida, o qual é adicionado sobre uma amostra branca e tratada como uma amostra problema. Normalmente é expressa como o desvio-padrão relativo dos diversos ensaios efectuados e é estimada com base na equação 5.

$$\% \text{RSD} = \frac{Sp}{md} * 100\% \quad (5)$$

onde:  $m_d \rightarrow$  a média das respectivas concentrações.

### 2.7.6 Exactidão de um método analítico

Neste parâmetro é expressa a proximidade do valor experimental (resultado analítico) a um valor aceite como verdadeiro ou de referência. As formas mais comuns utilizadas na sua avaliação são o uso de materiais de referência certificados, comparação de métodos e ensaios de recuperação analítica (Ribani *et al.*, 2004).

Frequentemente, a exactidão é medida como a recuperação do ensaio de quantidades conhecidas do anólito, adicionadas a uma amostra branca da matriz em análise (Ribani *et al.*, 2004; Bhardwaj *et al.*, 2016). A exactidão pode ser estimada a partir da equação 6.

$$\% \text{Rec} = \frac{C_{\text{exp}}}{C_t} * 100\% \quad (6)$$

onde: % Rec – recuperação analítica em percentagem;  $C_{\text{exp}}$  – concentração obtida experimentalmente;  $C_t$  – concentração teórica ou esperada.

### 2.7.7 Robustez

A robustez de um método pode ser entendida como uma medida da sua sensibilidade ao sofrer pequenas modificações em certos parâmetros. Em cromatografia gasosa, a programação da temperatura e a natureza do gás de arraste são factores que podem afectar o desempenho do método. O processo de extracção do anólito, por exemplo, pode ser afectado pelo tempo de extracção, velocidade da agitação, pH e outros factores (Ribani *et al.*, 2004).

Em geral, em uma validação devem ser considerados todos os parâmetros acima recomendados, mas em particular, o programa e o tipo de validação dependem das características do método em estudo e das aplicações para as quais foi proposto. Os resultados da validação do método podem servir como base de avaliação da qualidade, confiabilidade e consistência dos resultados analíticos precedentes (Bhardwaj *et al.*, 2016).

### **3 PARTE EXPERIMENTAL**

#### **3.1 Metodologia**

##### **3.1.1 Colheita de amostras**

Nesta pesquisa foram colhidas amostras de peixe tilápia nas regiões dos rios Umbelúzi, Zambeze e lago Maganha. As amostras de legumes foram colhidas nas províncias de Maputo (distritos de Boane, Matola e Moamba), Tete (cidade de Tete e distrito de Angónia) e Nampula (distrito de Larde). Adicionalmente, foram colhidas as amostras de peixe-gato nos distritos da Matola e Larde. Após a colheita, todas as amostras foram envolvidas com papel de alumínio, inseridas em sacos plásticos e conservadas em caixas isotérmicas contendo gelo, e transportadas até ao laboratório do Departamento de Química da Universidade Eduardo Mondlane, onde foram conservadas em congeladores abaixo de 4 °C até à análise. Os pontos de amostragem foram escolhidos de modo a incluir regiões agrícolas nas margens dos rios partilhados com países vizinhos (rios Zambeze e Umbelúzi) e regiões agrícolas isoladas (Larde). A Figura 13 ilustra os locais de amostragem.

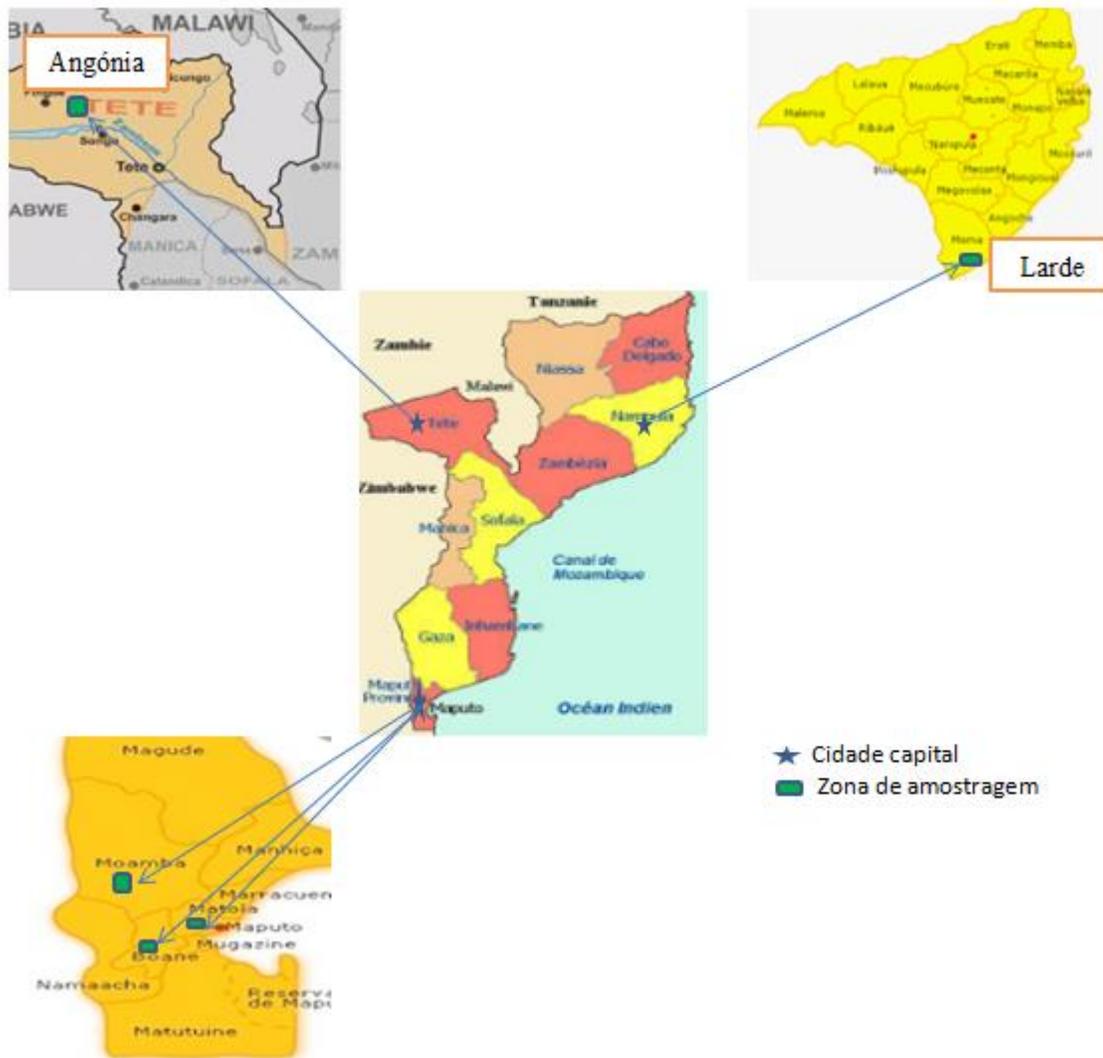


Figura 13. Zonas amostradas por província

Fonte: Google map e adaptações do autor

### 3.1.1.1 Preparação da amostra

Os tecidos musculares das amostras do peixe tilápia e peixe-gato, assim como as folhas de vegetais (couve e repolho) foram extraídos manualmente com facas e tesouras de metal. Para cada amostra, foram tomados cerca de 700 g de folhas vegetais e 400 g do músculo do peixe, os quais foram submetidas a uma secagem em um liofilizador (Labconco), seguida de uma moagem em um liquidificador doméstico. Em seguida, cada amostra foi preservada em papel de alumínio até à extracção dos pesticidas pelo método “QuEChERS” de acordo com a

metodologia proposta por Prestes e colaboradores (2011), modificada pela incorporação da proteína da semente de moringa como adsorvente.

### **3.1.2 Optimização das condições da extracção**

A optimização foi feita a partir de um desenho experimental factorial  $2^n$  ( $n=3$ ), usando-se o pacote estatístico Minitab 17. Para o efeito, foram feitos 8 ensaios com uma réplica, totalizando-se 16 ensaios, nos quais foram seleccionados três factores dos que podem afectar a eficiência da extracção: velocidade de extracção, composição da mistura solvente e tempo de extracção. Cada factor foi avaliado em dois níveis segundo a Tabela 2. As suas influências foram avaliadas a partir do gráfico de efeitos principais e pelo modelo de regressão linear.

Tabela 2. Níveis dos factores avaliados e rendimento da extracção

Número do ensaio	Ordem ensaio	Ponto central	Blocos	Velocidade de extracção (rpm)	Tempo da extracção (min)	Combinação de solventes (AcN:MeOH)	A/API
1	1	1	1	1500	2	50:50	1,474
15	2	1	1	3200	2	50:50	0,004
14	3	1	1	1500	5	50:50	0,002
2	4	1	1	3200	2	90:10	1,493
7	5	1	1	3200	2	50:50	0,047
5	6	1	1	3200	5	90:10	1,139
3	7	1	1	1500	5	90:10	0,003
6	8	1	1	1500	5	50:50	0,017
11	9	1	1	1500	5	90:10	0,001
8	10	1	1	1500	2	90:10	1,105
10	11	1	1	3200	2	90:10	1,658
4	12	1	1	3200	5	50:50	1,074
12	13	1	1	3200	5	50:50	0,921
16	14	1	1	1500	2	90:10	1,086
9	15	1	1	1500	2	50:50	1,107
13	16	1	1	3200	5	90:10	0,983

onde: AcN – acetone nitrilo; MeOH – metanol; A – área do pico do anólito; API – área do pico do padrão interno

### 3.1.3 Extracção de pesticidas pelo método QuEChERS

#### a) Teste de linearidade e determinação dos limites de detecção e de quantificação

A quantificação dos pesticidas em amostras de peixes e vegetais foi antecedida pela validação do método analítico. Para o efeito, foram preparadas diferentes concentrações dos padrões analíticos para cada pesticida pesquisado. Cada padrão foi dissolvido em metanol (MeOH) grau HPLC. A todos os padrões de calibração, foram adicionados 100 µL do padrão interno (trifenilfosfina a 1000 µg.L<sup>-1</sup>) e diluídos para um volume final de 1 mL com a solução mistura ácido acético (HAc) 1% em acetonitrilo (AcN) e metanol (MeOH) 90:10 respectivamente.

A linearidade do método em estudo foi avaliada a partir do factor de correlação linear ( $R^2$ ) em cada curva de calibração dos respectivos compostos. Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram determinados a partir do desvio padrão da linha de regressão, segundo as equações 3 e 4 anteriormente apresentadas na secção 2.6.4.

#### b) Testes de recuperação analítica da extracção

Para avaliação da recuperação e da repetibilidade do método analítico proposto foram avaliados três níveis de concentrações, com base na fortificação da amostra com os padrões analíticos dos pesticidas pesquisados. A fortificação foi feita em amostras brancas (couve cultivada sem administração de pesticidas e peixe tilápia criado em aquário). Para a matriz da couve, cada nível de concentração foi testado em três réplicas ( $n = 3$ ) e no peixe foram ensaiadas cinco réplicas ( $n = 5$ ). Após a extracção, os extractos de cada concentração testada foram tratados com PSA e proteína das sementes da Moringa (Mor-P) como adsorventes da fase de limpeza. Para o efeito, seguiu-se o procedimento “QuEChERS” descrito por Prestes e colaboradores (2011) com algumas modificações, onde o volume correspondente à concentração desejada de cada padrão foi pipetado e adicionado a 10 g da amostra branca contida no tubo de centrifugação de 50 mL. A seguir, 1 mL da solução do padrão interno trifenilfosfina a 1000 µg L<sup>-1</sup> foi adicionado. Deixou-se a mistura em repouso por 30 min, adicionou-se 10 mL da solução 1% HAc em AcN:MeOH (90:10). A mistura foi agitada em vortex a 3200 rpm durante 2 min. A seguir, 1 g de NaCl e 4 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> previamente secos em estufa a 110 °C por 3 h foram adicionados ao tubo de centrifugação. A mistura foi agitada em vortex a 3000 rpm por 1 min e centrifugada a 4000 rpm durante 5 min. A seguir, tomou-se 2 mL do sobrenadante para um outro tubo teflon de 15 mL, ao qual foram adicionados 150

mg da proteína de sementes da moringa e 300 mg de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e a mistura foi agitada e centrifugada nas condições anteriores. O sobrenadante foi filtrado usando-se o filtro acrodisc Polyvinylidene Fluoride (PVDF) 0,45 µm para seringa. Finalmente, 1 mL do filtrado foi tomado para um frasco âmbar com septo de 1.5 mL, seguindo-se a posterior a injeção em GC-MS.

#### **c) Teste de selectividade dos adsorventes**

Na avaliação da selectividade dos adsorventes da extracção, uma mistura dos compostos pesquisados foi adicionada a amostras brancas da couve e de peixe. A mistura foi submetida a todas as etapas da extracção nos dois adsorventes (PSA) e (Mor-p), seguida de injeção em GC-MS.

#### **d) Análise de amostras reais**

Após a validação do método analítico, seguiu-se a sua aplicação, a partir do qual foram analisadas amostras de repolho, couve, peixe tilápia e peixe-gato colhidos em diferentes mercados de três regiões de Moçambique, nomeadamente: províncias de Maputo, Nampula e Tete.

Durante a análise de contaminantes orgânicos em amostras de vegetais e peixes, por vezes as suas concentrações são baixas comparativamente com as dos outros componentes da matriz, ou ainda inferiores que o LOQ dificultando assim a sua quantificação. Para facilitar a quantificação, torna-se necessário um pré-enriquecimento das amostras pela solução-padrão do composto a determinar (Kumari *et al.*, 2001; Monica *et al.*, 2014; Lehotay *et al.*, 2010; Farina *et al.*, 2016). Neste estudo, todas as amostras foram enriquecidas pelas soluções-padrão de cada composto pesquisado, com a excepção do 4-nonilfenol e profenofos. Para o efeito, foram tomados volumes correspondentes de cada solução padrão e diluídas pela solução amostra a uma concentração final de 0,5 mgKg<sup>-1</sup> de cada composto. Posteriormente, as soluções foram agitadas e seguidas de leitura em GCxGC-TOFMS.

Para a extracção de pesticidas e 4-nonilfenol em amostras de peixe e legumes, seguiu-se todas as etapas do teste de recuperação (procedimento b), substituindo-se a amostra branca pela amostra analítica, com a excepção da adição do padrão analítico.

### 3.1.4 Condições analíticas usadas em cromatografia gasosa

Para os testes de validação, as análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás (GC 7820A) acoplado a um espectrômetro de massa (MSD 5977B) Agilent Technologies, Figura 14 (i). A separação foi feita em uma coluna capilar SH-Rtx-5MS: 30m x 250  $\mu\text{m}$  x 0,25  $\mu\text{m}$ , - 60  $^{\circ}\text{C}$  - 330  $^{\circ}\text{C}$ , onde 1  $\mu\text{L}$  da amostra foi injectado em modo *splitless*. Para o arraste foi usado o gás hélio 99,9997% em um fluxo de 35  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$  à pressão de 13,265 kPa. As análises foram realizadas no modo SCAN para identificação e a quantificação foi feita no modo SIM de impacto electrónico com a energia de ionização de 70 eV. A temperatura de injeção foi mantida em 250  $^{\circ}\text{C}$ , a do forno foi iniciada a 70  $^{\circ}\text{C}$  (5 min), depois aumentada para 190  $^{\circ}\text{C}$  (20 min) a uma taxa de 30  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , e finalmente aumentada para 300  $^{\circ}\text{C}$  (15 min) a uma taxa de 20  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , o tempo total de corrida foi de 49,50 minutos. A identificação dos compostos foi feita a partir da comparação dos espectros dos seus iões moleculares característicos (m/z) com os espectros da base de dados da biblioteca NIST 14.

As amostras reais foram analisadas em GCxGC-TOFMS (Figura 15 (ii)) onde resumidamente: 1  $\mu\text{L}$  de cada extracto foi injectado em uma coluna capilar primária (Rxi®-5Sil MS: 30 m x 0,25mmID x 0,25  $\mu\text{m}$ ) em modo *splitless* e seguida de uma separação subsequente em uma coluna capilar secundária (Rxi®-17Sil MS: 1,2 m x 0,25 mmID, 0,25  $\mu\text{m}$ , max prog Temp 360  $^{\circ}\text{C}$ ). O hélio 99,9995% foi utilizado como fase móvel em um fluxo de 0,8  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , com a modulação feita em injeções alternadas de nitrogénio quente e frio. A análise foi feita no modo de impacto electrónico com energia de ionização de 70 eV. A temperatura de injeção foi mantida em 250  $^{\circ}\text{C}$ . A temperatura inicial da coluna foi de 80  $^{\circ}\text{C}$  (0 min), depois aumentada para 150  $^{\circ}\text{C}$  (3 min) a uma taxa de 25  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  e finalmente aumentada para 250  $^{\circ}\text{C}$  (2 min) a uma taxa de 20  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ . O tempo total de análise foi de 15,65 min. A identificação dos compostos orgânicos foi feita comparando-se os espectros de cada componente eluído com os espectros presentes na base de dados da biblioteca Mainlib Replib utilizando uma pontuação de 80%. As massas (m/z) dos iões característicos de cada composto pesquisado são apresentadas na Tabela 3 a seguir:

Tabela 3. Iões característicos de cada composto pesquisado

Composto	Iões característicos (m/z)	Ião de quantificação	Tr (min) GC-MS	Tr (min) GCxGC/TOFMS	Massa molar
$\beta$ -HCH	109; 219; 254	109	15,731	8,09	290,83
$\gamma$ -HCH	181; 219; 254	181	15,544	8,06	290,83
Cipermetrina	163; 207; 281	163	37,316	14,06	416,30
4,4-DDD	165; 235; 320	235	32,189	11,30	320,0
4,4-DDT	165; 235; 354	235	33,620	11,33	354,48
4-Nonilfenol	77; 107; 220	107	17,461	8,45	220,35
Profenofos	139; 208; 337	208	31,096	10,48	373,63
Trimetilfosfina	108; 183; 262	183	32,827	10,54	262,29

Tr-tempo de retenção

Na Figura 14 a seguir, são apresentados os dois sistemas de cromatografia gasosa GC-MS (i) e GCxGC/TOFMS (ii) com sistema de gerador de nitrogénio (a) usados durante as análises laboratoriais.

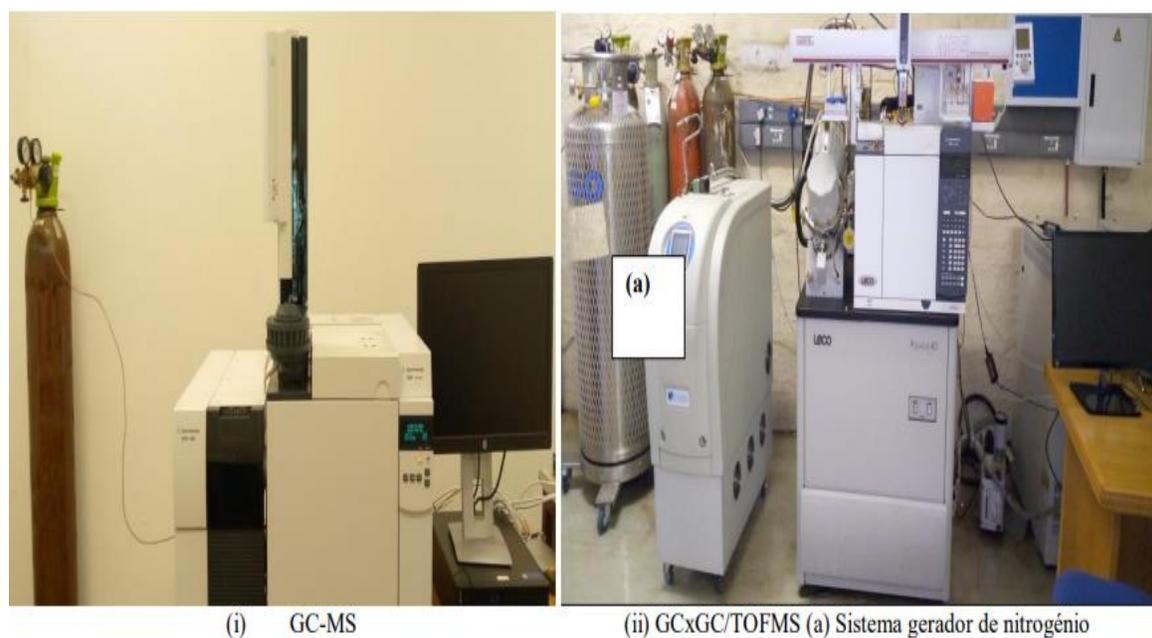


Figura 14. Esquema dos sistemas cromatográficos usados para a leitura

### 3.1.5 Avaliação estatística dos resultados

Para a comparação das recuperações analíticas usando o PSA) e Mor-p foi usado o teste estatístico “*t*” a uma probabilidade  $p = 0,05$ , ou seja, a um nível de confiança de 95%.

Segundo Miller e Miller (2010) na proposta de um novo método analítico, os seus resultados devem ser testados pela comparação com os obtidos pelo método de referência. No presente estudo, admitindo a hipótese nula de que usando os dois adsorventes tem-se o mesmo resultado, ou seja,  $H_0: \mu_1 = \mu_2$ , é necessário testar se as médias das recuperações por eles geradas diferem significativamente ou não.

Caso as duas médias não apresentem desvios-padrão significativamente diferentes, uma estimativa combinada do desvio padrão (*sp*) pode ser calculado a partir dos dois desvios-padrão individuais  $s_1$  e  $s_2$ , usando-se a equação 7.

$$sp = \sqrt{\frac{(n_1-1)s_1^2 + (n_2-1)s_2^2}{(n_1+n_2-2)}} \quad (7)$$

De seguida, as médias amostrais dos dois adsorventes foram testadas a partir do “*t*” experimental, o qual foi comparado com um valor  $t_{crit}$  tabelado. Para os casos em que as variâncias amostrais foram iguais, o “*t*” foi estimado pela equação 8.

$$t_{ob} = \frac{x_1 - x_2}{sp * \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad (8)$$

Por outro lado, nos casos em que as médias apresentaram desvios-padrão significativamente diferentes, o “*t*” foi calculado usando-se a equação 9 e o número de graus de liberdade para  $t_{crit}$  foi determinado pela equação 10.

$$t_{ob} = \frac{x_1 - x_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad (9) \quad v = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{s_1^4}{n_1^2(n_1-1)} + \frac{s_2^4}{n_2^2(n_2-1)}} \quad (10)$$

onde:  $t_{ob}$  – valor experimental, estimado a partir das médias das recuperações analíticas nos dois adsorventes;

$s_1$  e  $s_2$  – desvios-padrão amostrais das médias geradas pelos dois adsorventes;

$n_1$  e  $n_2$  – número de réplicas ensaiadas para cada adsorvente;

$v$  – número de graus de liberdade;

$x_1$  e  $x_2$  – recuperações médias obtidas a partir dos adsorventes PSA e Mor-p respectivamente.

### **3.1.6 Avaliação do risco para a saúde do consumidor por ingestão de vegetais e peixe contaminados por poluentes orgânicos persistentes**

Uma forma básica usada para avaliar o potencial risco sobre os ecossistemas e saúde pública devido à exposição a substâncias tóxicas baseia-se na comparação das concentrações desses poluentes em amostras, com os níveis máximos regulamentados por diferentes entidades públicas nacionais ou internacionais (Gbeddy *et al.*, 2012). Para o efeito, diferentes parâmetros foram estabelecidos, a destacar os limites máximos residuais (MRLs), o índice de toxicidade (PTI) e o quociente de perigo (HQ) desse poluente.

O PTI do pesticida, por exemplo, é um parâmetro de triagem usado na avaliação da potência de toxicidade, associada à acção conjunta de vários resíduos de pesticidas presentes no alimento (Chaikasem e Roi-et, 2020). Por outro lado, o PTI pode ainda ser usado para estimar quantos resíduos de pesticidas afectam a qualidade da amostra (Chaikasem e Roi-et, 2020; Shalaby *et al.*, 2021).

Para além do PTI, o HQ tem sido usado para avaliar o risco ecológico devido aos efeitos dos pesticidas no meio ambiente. Segundo Chaikasem e Roi-et (2020), Shalaby e colaboradores (2021) e Zhang e colaboradores (2021), estes indicadores podem ser calculados usando-se as equações 11 e 12 a seguir:

$$HQ = \frac{C_p}{MRL} \quad (11) \quad \text{e} \quad PTI = \sum HQ \quad (12)$$

onde:  $C_p$  - concentração do composto ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) na amostra; MRL- Limite máximo residual ou concentração máxima permitida ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ).

Adicionalmente ao PTI, o risco à saúde dos consumidores, causado pela ingestão de vegetais e peixes contaminados com pesticidas, foi estimado por meio do índice de risco à saúde (HI). Este indicador foi calculado de acordo com a equação sugerida por Shalaby *et al.*, (2021). Esta regra consiste em dividir a ingestão diária estimada (EDI) pelos valores correspondentes da ingestão diária aceitável (ADI) em  $\text{mg.kg}^{-1}$  conforme mostra a equação 13:

$$HI = \frac{EDI}{ADI} \quad (13)$$

A ingestão diária estimada (EDI) dos vários pesticidas em cada espécie vegetal e em peixe foi determinada usando a equação 14 (Mumtaz *et al.*, 2015; Shalaby *et al.*, 2021).

$$EDI = \frac{Cp \cdot D}{bw} \quad (14)$$

onde:

D - ingestão média diária na região africana, estimada em 38,8 g/pessoa.dia para vegetais frescos e para peixes de águas frescas em 6.1 g/pessoa.dia (WHO, 2003a)

bw - o peso corporal médio que é estimado em 60 kg para um indivíduo adulto e 15 kg para criança (Mbabazi, 2011).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Resultados da otimização das condições de extracção

Os resultados da otimização dos parâmetros da extracção são apresentados nos gráficos dos efeitos principais (Fig. 15) e pela equação do modelo linear (eq. 15).

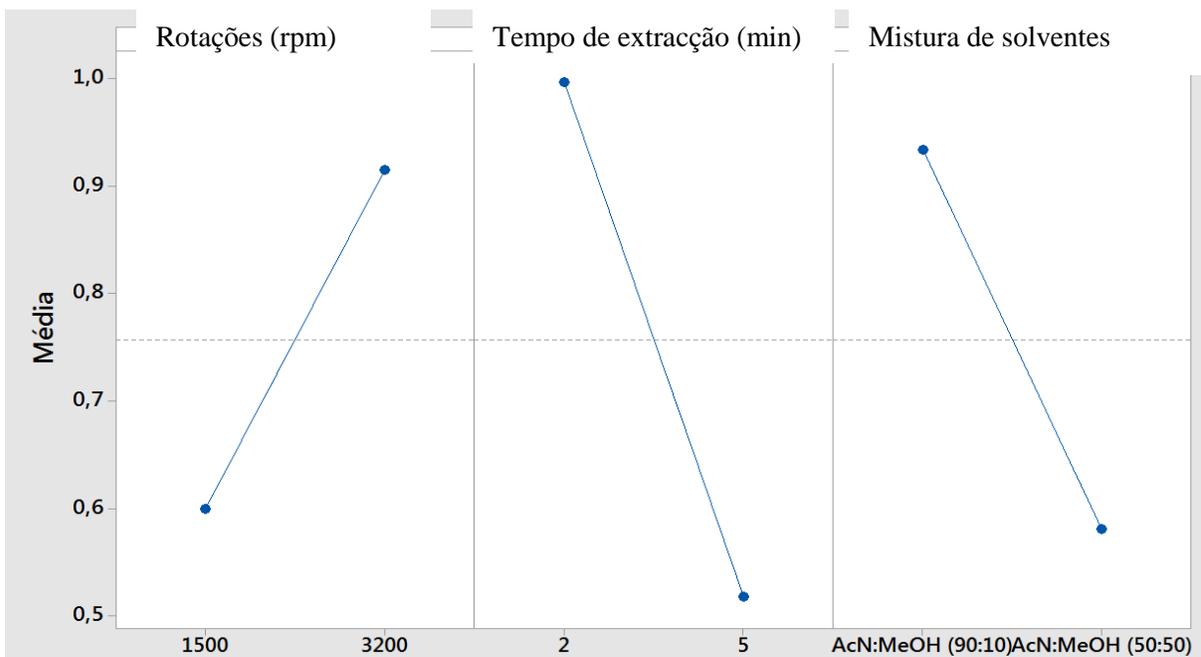


Figura 15. Gráfico de efeitos principais para a média do sinal A/API

Onde: A-área do anólito; API-área do padrão interno

$$A/API = 0,737 - 0,005 \text{ Velocidade da rotação do vórtex (1500) rpm} + 0,005 \text{ Velocidade da rotação do vórtex (3200) rpm} + 0,127 \text{ Tempo de extracção (2) min} - 0,127 \text{ Tempo de extracção (5) min} + 0,027 \text{ Mistura de solventes (AcN:MeOH)[90:10]} - 0,027 \text{ Mistura de solventes (AcN: MeOH)[50:50]} \quad (15)$$

### 4.2 Resultados da linearidade, limites de detecção e de quantificação

Os resultados do estudo da linearidade e das determinações dos limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) são apresentados na Tabela 4 a seguir:

Tabela 4. Resultados do estudo da linearidade, limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) do método analítico na matriz da couve

Parâmetro	Intervalo de calibração (mg L <sup>-1</sup> )	Equação da recta	R <sup>2</sup>	LOD (mg kg <sup>-1</sup> )	LOQ (mg kg <sup>-1</sup> )
β-HCH	1;1.2;1.4;1.6;1.8	Y=0,0801x-0,0549	0,9823	0,16	0,49
γ-HCH	0,1;0,2;0,5;0,7;0,9	Y=2,3443x-0,0417	0,9899	0,13	0,39
Cipermetrina	0,18;0,25;0,4;0,6;0,7;0,8	Y=0,1033x-0,0027	0,9920	0,08	0,25
p,p'-DDD	0,1;0,2;0,3;0,5;0,6	Y=0,1855x-0,0118	0,9817	0,11	0,33
p,p'-DDT	0,1;0,2;0,3;0,5;0,6	Y=1,2302x-0,1115	0,9885	0,09	0,26
4-Nonilfenol	0,4;0,5;0,6;0,8;1	Y=1,1779x-0,2831	0,9706	0,16	0,48
Profenofos	0,4;0,6;1;1,2;1,4	Y=0,0718x-0,012	0,9896	0,16	0,49

Tabela 5. Resultados do estudo da linearidade, limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) do método analítico na matriz do peixe

Parâmetro	Intervalo de calibração (mg L <sup>-1</sup> )	Equação da recta	R <sup>2</sup>	LOD (mg kg <sup>-1</sup> )	LOQ (mg kg <sup>-1</sup> )
β-HCH	0,50; 1,20; 1,40; 1,60; 1,80	Y=0,0481x-0,0067	0,9826	0,01	0,03
γ-HCH	0,02; 0,067; 0,13; 0,25; 0,30	Y=1,4833x-0,0119	0,9971	0,01	0,03
Cipermetrina	0,133; 0,20; 0,25; 0,35; 0,45	Y=0,2171x-0,0015	0,9884	0,04	0,12
p,p'-DDD	0,10; 0,20; 0,30; 0,50; 0,60	Y=0,1717x-0,0074	0,9945	0,005	0,15
p,p'-DDT	0,02; 0,11; 0,165; 0,22; 0,35	Y=1,2775x-0,0188	0,9938	0,005	0,02
4-Nonilfenol	0,02; 0,13; 0,20; 0,25; 0,30	Y=1,3956x-0,0083	0,9999	0,01	0,03
Profenofos	0,02; 0,20; 0,30; 0,40; 0,55	Y=0,8349x-0,0283	0,9907	0,01	0,03

### 4.3 Resultados dos testes da exactidão e da precisão do método de extracção

Os resultados das recuperações analíticas, repetibilidade e teste estatístico “t” para comparação das médias entre as recuperações analíticas de ambos os adsorventes nas matrizes da couve e do peixe são apresentados nas Tabela 6 e 7, respectivamente.

**Tabela 6:** Resultados dos testes de recuperação e de precisão do método em amostras de couve (P =0,05; tcrit.=2,78)

Composto	Conc (mg.kg <sup>-1</sup> )	PSA		Mor-p		<i>t<sub>ob</sub></i>	Obs
		%Rec ± dp	(%RSD)	%Rec. ± dp	(%RSD)		
β-HCH	1,25	111 ± 11	10,30	107 ± 11	9,83	0,45	Val
	1,45	110 ± 6	5,18	104 ± 7	7,13	1,11	Val
	1,65	105 ± 10	9,84	107 ± 9	8,30	0,25	Val
γ-HCH	0,45	71 ± 3	3,96	110 ± 6	4,99	10,9	N. val
	0,65	71 ± 3	3,75	74 ± 2	2,93	1,51	Val
	0,85	105 ± 11	10,31	100 ± 8	8,22	0,64	Val
Cipermetrina	0,30	71 ± 6	8,38	69 ± 1	1,58	0,57	Val
	0,50	96 ± 12	12,01	90 ± 3	3,38	0,87	Val
	0,65	87 ± 12	13,71	75 ± 3	3,52	1,70	Val
p,p'-DDD	0,35	88 ± 6	6,34	94 ± 10	10,92	0,89	Val
	0,45	83 ± 2	3,10	88 ± 5	5,88	1,50	Val
	0,55	103 ± 14	13,06	84 ± 2	2,79	2,41	Val
p,p'-DDT	0,35	102 ± 4	4,13	86 ± 7	7,78	3,30	N.val.
	0,45	107 ± 4	3,88	108 ± 6	5,79	0,23	Val
	0,55	85 ± 5	5,93	87 ± 6	6,67	0,45	Val
4-Nonilfenol	0,45	74 ± 4	4,69	114 ± 12	10,68	5,47	N. val
	0,65	75 ± 4	5,03	102 ± 8	7,74	5,35	N. val
	0,85	79 ± 2	2,64	81 ± 7	8,32	0,49	Val
Profenofos	0,65	111 ± 10	9,01	94 ± 11	12,14	1,94	Val
	0,85	76 ± 2	3,18	85 ± 9	10,64	1,66	Val
	1,1	84 ± 8	9,78	80 ± 5	5,80	0,73	Val

PSA: *Primary secondary amine*; Mor-p: Proteína da semente da moringa; Val: validado; N. val: não validado

Tabela 7 Resultados dos testes de recuperação e de precisão do método em amostras de peixe (P = 0,05)

Composto	Conc (mg.kg <sup>-1</sup> )	PSA		Mor-p		<i>t<sub>ob</sub></i>	<i>t<sub>crit</sub></i>	Obs
		%Rec.±dp	(%RSD)	%Rec.±dp	(%RSD)			
β-HCH	1,25	80 ± 4	5,18	83 ± 8	9,02	1,05	4,30	Val
	1,45	78 ± 1	0,92	77 ± 3	3,70	0,87	4,30	Val
	1,65	71 ± 4	5,10	71 ± 3	3,68	0,41	4,30	Val
γ-HCH	0,10	92 ± 1	1,35	92 ± 1	1,21	0,14	2,31	Val
	0,20	96 ± 1	0,61	96 ± 5	5,56	0,05	2,78	Val
	0,275	94 ± 1	0,49	91 ± 3	3,00	1,80	2,78	Val
Cipermetrina	0,22	82 ± 5	5,88	71 ± 2	2,22	<b>4,85</b>	<b>2,57</b>	N.val
	0,33	82 ± 4	5,25	80 ± 4	5,27	0,89	2,31	Val
	0,43	78 ± 3	3,64	82 ± 7	8,29	1,20	2,31	Val
p,p'-DDD	0,25	85 ± 3	2,66	86 ± 2	2,04	0,76	2,31	Val
	0,35	84 ± 7	7,85	88 ± 6	6,77	0,81	2,31	Val
	0,45	86 ± 7	7,64	88 ± 3	3,20	0,44	2,31	Val
p,p'-DDT	0,10	83 ± 5	5,87	84 ± 4	4,00	0,37	2,31	Val
	0,20	86 ± 1	0,61	74 ± 5	6,43	<b>5,80</b>	<b>2,78</b>	N. val
	0,30	87 ± 2	2,55	88 ± 2	2,41	1,09	2,31	Val
4-Nonilfenol	0,15	109 ± 3	2,62	110 ± 1	0,43	0,84	2,78	Val
	0,23	107 ± 1	0,67	106 ± 3	3,04	0,90	2,78	Val
	0,275	98 ± 1	0,54	102 ± 2	2,35	<b>3,73</b>	<b>2,78</b>	N. val
Profenofos	0,25	61 ± 3	4,25	59 ± 4	6,06	0,88	2,31	Val
	0,35	60 ± 0.3	0,54	58 ± 1	1,55	<b>3,05</b>	<b>2,57</b>	N. val
	0,5	60 ± 1	0,98	58 ± 3	5,64	0,93	2,78	Val

PSA: Primary secondary amine; Mor-p: Proteína da semente da moringa

Val: validado; N. val: não validado

#### 4.4 Resultados do teste da selectividade dos adsorventes

Nas Figuras 16 e 17 são apresentados os cromatogramas de resultados do teste de selectividade dos adsorventes PSA (a) e Mor-p (b) nas matrizes da couve e do peixe, respectivamente.

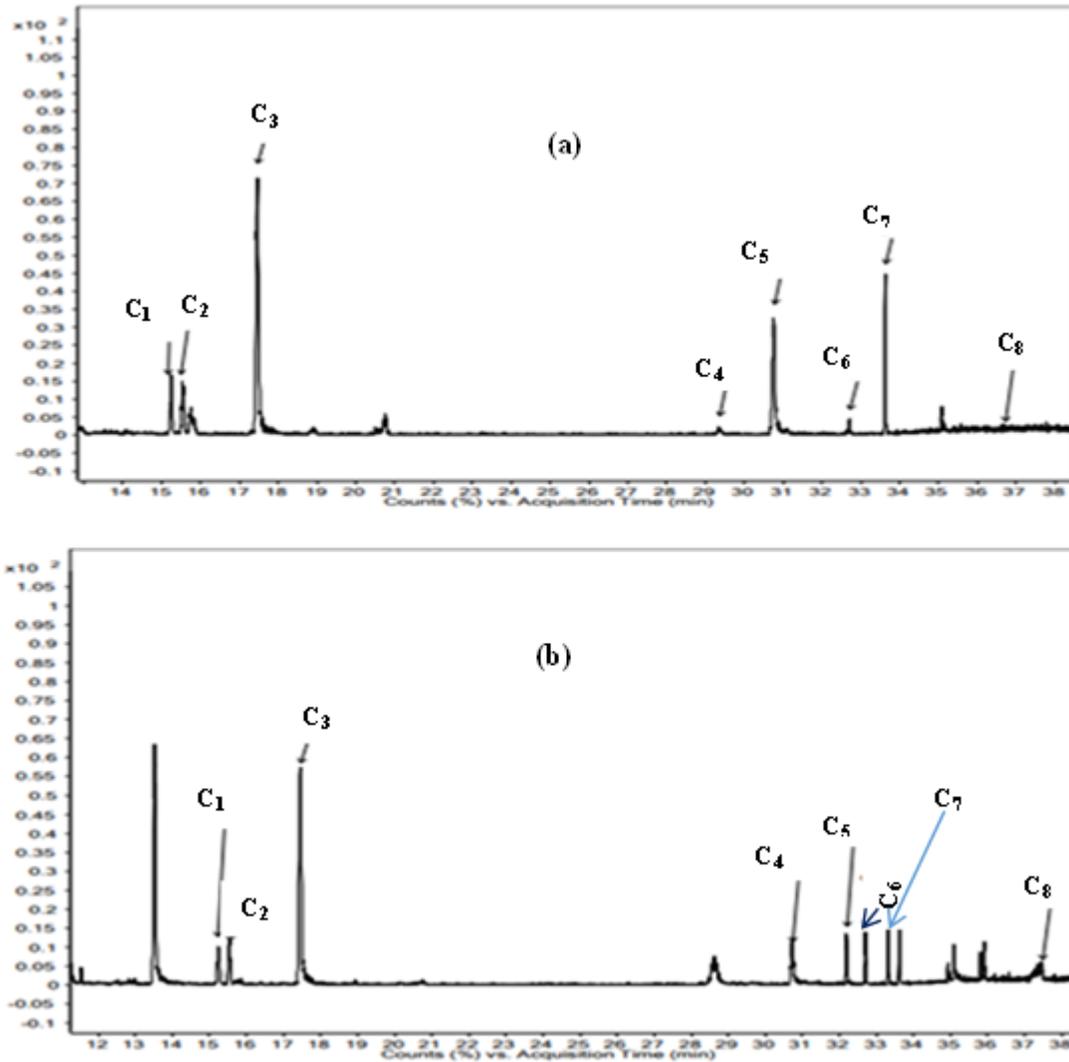


Figura 16. Cromatogramas da mistura de padrões analíticos na matriz da couve usando os adsorventes PSA (a) e Mor-p (b)

C<sub>1</sub>:  $\gamma$ -HCH; C<sub>2</sub>:  $\beta$ -HCH; C<sub>3</sub>: 4-Nonilfenol; C<sub>4</sub>: Trifenilfosfina; C<sub>5</sub>: Profenofos; C<sub>6</sub>: p,p'-DDD; C<sub>7</sub>: p,p'-DDT e C<sub>8</sub>: Cipermetrina

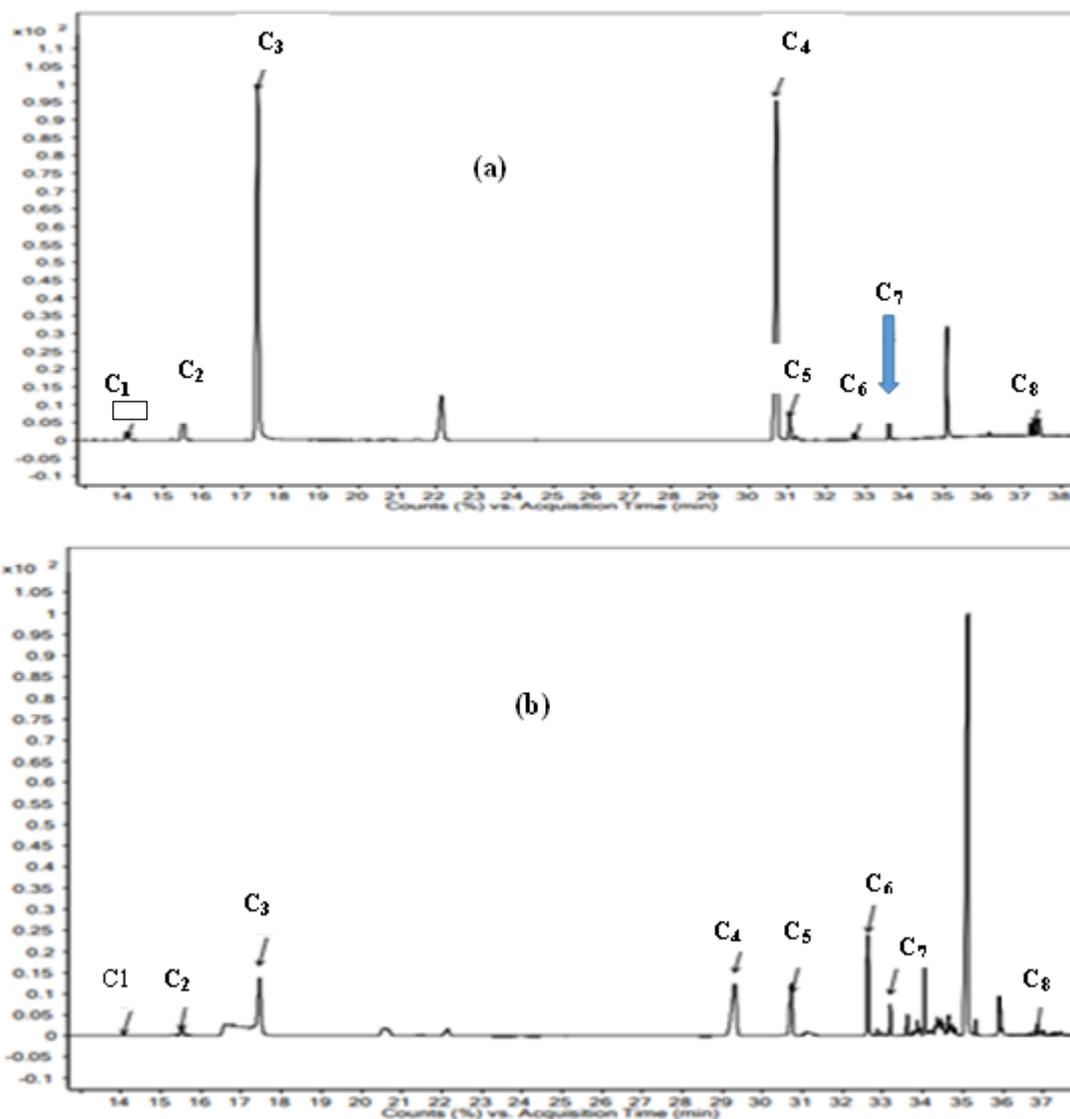


Figura 17. Cromatogramas da mistura de padrões analíticos na matriz de peixe usando o adsorvente PSA (a) e Mor-p (b)

C<sub>1</sub>: γ-HCH; C<sub>2</sub>: β-HCH; C<sub>3</sub>: 4-Nonilfenol; C<sub>4</sub>: Trifenilfosfina; C<sub>5</sub>: Profenofos; C<sub>6</sub>: p,p'-DDD; C<sub>7</sub>: p,p'-DDT e C<sub>8</sub>: Cipermetrina.

#### 4.5 Resultados de análise de amostras reais

Os resultados das leituras das amostras de cada matriz são apresentados nas tabelas 8, 9 e 10 a seguir:

**Tabela 8** Resultados da análise de amostras de couve colhidas em diferentes mercados

Amostra	Concentração $\pm$ sp (mg.kg <sup>-1</sup> )						
	B-HCH	$\gamma$ -HCH	Cipermetrina	p,p'-DDD	p,p'-DDT	4-Nonilfenol	Profenofos
2MC1	Nd	nd	nd	2,03 $\pm$ 0,003	nd	nd	nd
2MC2	Nd	0,642 $\pm$ 0,156	nd	0,318 $\pm$ 0,017	0,364 $\pm$ 0,008	nd	nd
BOAC1	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BOAC2	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BOAC3	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
MACHC	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
MOAC1	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
MOAC2	Nd	nd	nd	0,712 $\pm$ 0,022	nd	nd	nd
NPLAC1	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
NPLAC2	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PATC	Nd	0,475 $\pm$ 0,056		0,527 $\pm$ 0,018	nd	nd	nd
TeAgC1	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
TeAgC2	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	2,07 $\pm$ 0,34
T3C	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
ZVC	Nd	nd	nd	1,51 $\pm$ 0,21	nd	nd	nd

2MC: 2M couve; BOAC: Boane couve; MACHC: Machava couve; MOAC: Moamba couve; nd-Não detectável; NPLAC: Nampula Larde couve; PATC: Patrice couve; TeAgC Tete Angónia couve; T3C: T3 couve e ZVC: Zona verde couve

Tabela 9 Resultados da análise de amostras de repolho colhidas em diferentes mercados

Amostra	Concentração $\pm$ sp (mg.kg <sup>-1</sup> )						
	B-HCH	$\gamma$ -HCH	Cipermetrina	p,p'-DDD	p,p'-DDT	4-Nonilfenol	Profenofos
BOAR1	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BOAR2	Nd	nd	0,720 $\pm$ 0,011	nd	0,733 $\pm$ 0,013	nd	4,97 $\pm$ 0,36
BOAR3	1,61 $\pm$ 0,16	nd	nd	nd	nd	nd	nd
MACHR1	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	6,20 $\pm$ 0,69
MACHR2	Nd	nd	nd	0,782 $\pm$ 0,024	nd	0,191 $\pm$ 0,013	nd
MOAR1	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
MOAR2	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
NPLAR	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PATR1	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PATR2	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
T3R	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
TeAgR1	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
TeAgR2	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
ZVR	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

BOAR: Boane repolho; MACHR: Machave repolho; MOAR: Moamba repolho; nd: Não detectável; NPLAR: Nampula Larde repolho; PATR: Patrice repolho;

T3R: T3 repolho; TeAgR: Tete Angónia repolho; ZVR: Zona Verde repolho

**Tabela 10** Resultados da análise de amostras de peixe colhidas em diferentes mercados

Amostra	Concentração $\pm$ sp (mg.kg <sup>-1</sup> )						
	B-HCH	Y-HCH	Cipermetrina	p,p'-DDD	p,p'-DDT	4-Nonilfenol	Profenofos
BOATL1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BOATL2	nd	nd	nd	0,195 $\pm$ 0,026	nd	nd	nd
MOATL1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
MOATL2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
MATPG1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
MATPG2	nd	nd	nd	nd	nd	0,439 $\pm$ 0,014	nd
NPTLA1	nd	nd	nd	nd	nd	1,16 $\pm$ 0,12	nd
NPTLA2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
NPTLA3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
NPPGLA1	nd	0,213 $\pm$ 0,061	nd	nd	nd	0,826 $\pm$ 0,094	nd
NPGLA2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
TeTz1	nd	0,246 $\pm$ 0,070	nd	nd	nd	0,678 $\pm$ 0,017	nd
TeTz2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
TeTz3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

BOATL: Boane tilápia; MATPG: Matola peixe-gato; MOATL: Moamba tilápia; nd: Não detectável; NPTLA: Nampula tilápia Larde; NPPGLA: Nampula peixe-gato Larde; TeTz: Tete Tete tilápia Zambe

Várias pesquisas em matrizes similares foram realizadas em diferentes países e os resultados encontrados são apresentados na Tabela 11 a seguir.

**Tabela 11** Concentrações dos compostos analisados, em matrizes da couve, repolho e peixes em outras regiões do mundo

Composto (mg.kg <sup>-1</sup> )	Couve	Repolho	Peixe	País	Fonte
β-HCH	-	0,002	-	Nigéria	Oyeyiola <i>et al.</i> , 2017
γ-HCH	-	0,03–0,9	-	Gana	Amoah <i>et al.</i> , 2006
Cipermetrina	-	0,0997 ± 0,0032	0,1058 ± 0,0052	RSA	Nuapia <i>et al.</i> , 2016
	-	0,035; 0,062	-	Bangladesh	Alamgir <i>et al.</i> , 2013
	0,084 a 0,831	-	-	Tailândia	Wanwimolruk <i>et al.</i> , 2015
p,p'-DDD	0,08	-	-	Tailândia	Chaikasem e Roi-et, 2020
	-	0,141	-	Gana	Ko <i>et al.</i> , 2012
	-	-	0,1027	Turquia	Topal and Onac, 2020
	-	-	0,0097 ± 0,0045- 0,0283 ± 0,0058	Correia do Sul	Choi <i>et al.</i> , 2016

Tabela 11 (continuação)

	-	0,0957 ± 0,0021	-	RSA	Nuapia <i>et al.</i> , 2016
P,P'-DDT	-	0,02–0,9	-	Gana	Amoah <i>et al.</i> , 2006
	-	-	0,4324	Turquia	Topal and Onac, 2020
	-	0,1259 ± 0,0059	-	RSA	Nuapia <i>et al.</i> , 2016
4-Nonilfenol	-	0,696*	0,0022	China	Luo <i>et al.</i> , 2017
Profenofos	-	0,0047	-	China	Shi <i>et al.</i> , 2021
	-	-	5,64±0,44 a 13,72±0,87	Arábia Saudita	Mahboob <i>et al.</i> , 2015
	-	-	0,044 – 0,055	China	Luo <i>et al.</i> , 2017
	0,005 – 0,183	-	-	Tailândia	Wanwimolruk <i>et al.</i> , 2015
			< LOD a 18,80	Irão	Akhbarizadeh <i>et al.</i> , 2021

< LOD-Abaixo do limite de detecção; RSA-República da África do Sul

\* - Concentração do composto em matriz não especificada

#### 4.5.1 Resultados da avaliação do risco para a saúde do consumidor

Nas Figuras 18 e 19 são apresentados os resultados dos indicadores de risco para a saúde por ingestão de vegetais e peixe contaminados pelos poluentes determinados no presente estudo.

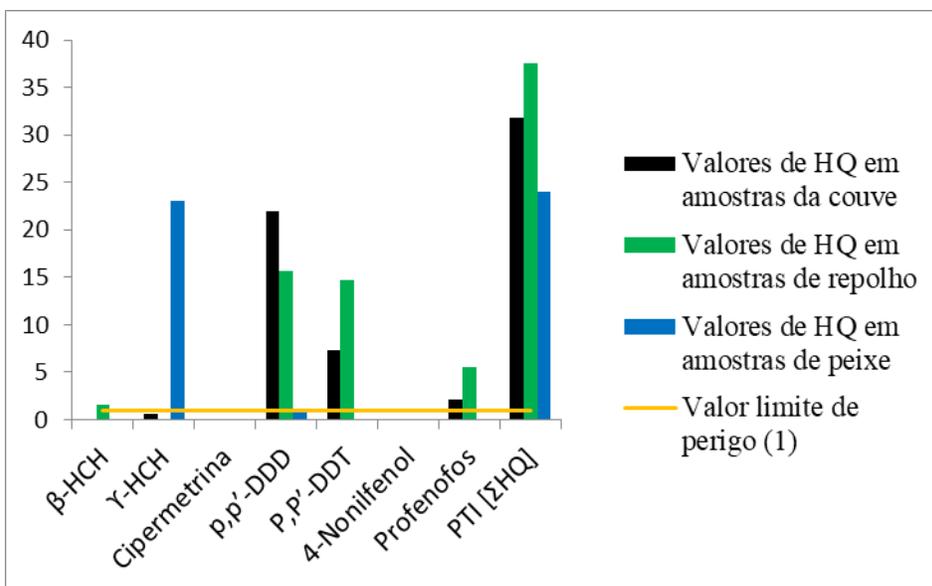


Figura 18 Valores dos quocientes de perigo (HQ) e dos índices de toxicidade dos pesticidas (PTI) para os diferentes pesticidas quantificados

Na Figura 19 a seguir são apresentados os valores do perigo calculados para indivíduos adultos (i) e para crianças (ii)

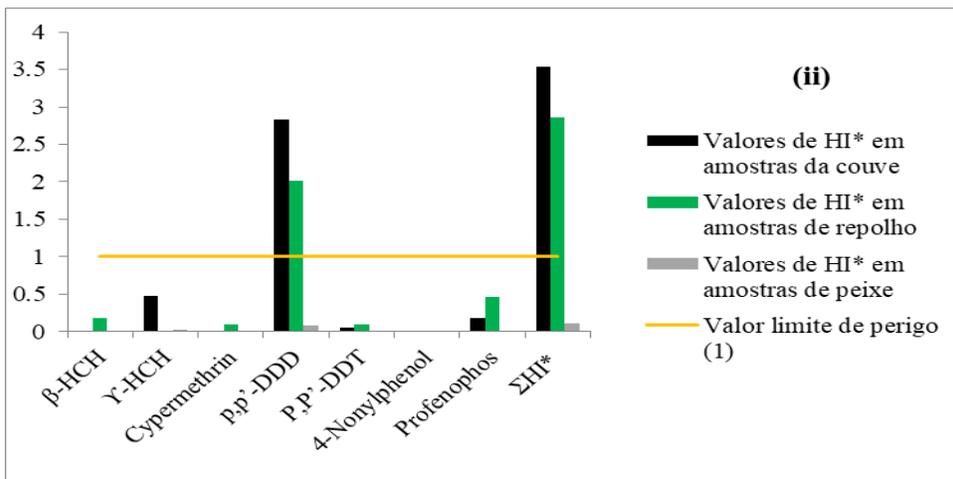
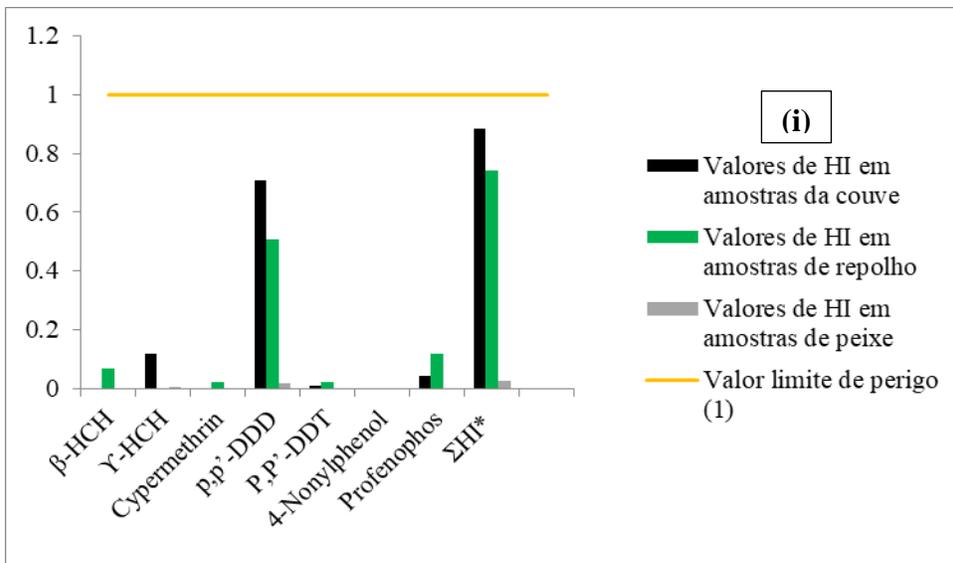


Figura 19 Valores do perigo calculados para indivíduos adultos (i) e para crianças (ii)

onde: HI-índice de perigo para os consumidores adultos e HI\*-índice de perigo para as crianças consumidoras de vegetais e peixes contaminados.

## 5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

### 5.1 Optimização das condições da extracção

Os resultados da optimização dos parâmetros da extracção (Fig. 15) e pelo modelo de regressão linear (equação 15) mostram que o rendimento da mesma aumenta com o aumento da velocidade da rotação do vórtex, isto é, de 1500 a 3200 rpm. Por outro lado, a extracção mostrou-se eficiente quando a quantidade do metanol na mistura AcN: MeOH diminui (de 50:50 a 90:10 v/v). O mesmo foi observado com a diminuição do tempo da extracção (de 5 a 2 min). A partir destas observações pode-se notar que a melhor extracção foi conseguida à velocidade da rotação do vórtex de 3200 rpm, durante 2 min usando a combinação AcN: MeOH (90:10).

### 5.2 Teste de linearidade, limites de detecção e quantificação

Observando os resultados do teste de linearidade ilustrados nas Tabelas 4 e 5, os valores de  $R^2$  variaram entre 0.9706 e 0.992 na matriz da couve e de 0.9826 e 0.9999 na matriz do peixe. Com estes valores pode-se afirmar que a maior linearidade foi conseguida usando-se extractos de peixe relativamente ao extracto da couve. No entanto, todos os valores de  $R^2$  estiveram acima de 0.90, que é considerado o valor mínimo aceitável para efeitos da validação de uma metodologia (Ribani e colaboradores, 2004). Pelo que, os métodos analíticos apresentam boa linearidade para ambas as matrizes.

O limite de detecção (LOD) variou de 0.08 a 0.16 mg/kg e o de quantificação (LOQ) variou de 0.25 a 0.49 mg Kg<sup>-1</sup> para a matriz da couve. Na matriz do peixe, os valores de LOD variaram de 0.005 a 0.04 mg Kg<sup>-1</sup> e os de LOQ variaram de 0.02 a 0.15 mg.Kg<sup>-1</sup>. Os limites de quantificação determinados neste estudo em ambas as matrizes foram superiores aos recomendados pela OMS segundo Mbabazi (2011), para a qual o LOQ ideal para um método analítico deve estar no intervalo de 0.01 a 0.05 mg Kg<sup>-1</sup>.

### 5.3 Avaliação da recuperação analítica e precisão do método de extracção

Os testes de recuperação analítica do método na matriz da couve (tabela 6), as recuperações variam de 69 ± 1 a 114 ± 12%. Na matriz do peixe, as recuperações variam de 58 ± 3 a 110 ± 1%. Estes valores encontram-se dentro do intervalo recomendando. Segundo informações da

literatura aberta, a IUPAC recomenda que na validação de um método analítico, a recuperação considera-se aceitável no intervalo de 70 a 120% (Odewale *et al.*, 2021). Por outro lado a Associação Oficial dos Químicos Analíticos (AOAC) (2016) recomenda que no teste de recuperação analítica, para concentrações que variam no intervalo de 0,1 a 10 mg kg<sup>-1</sup>, a recuperação analítica deve estar entre 80 a 110%. Pode-se verificar que na maior parte dos compostos estudados, em todos os níveis das concentrações avaliadas, os valores de “*t<sub>cal</sub>*” foram menores que o valor de *t<sub>crítico</sub>* (2.78), mostrando não haver diferenças significativas entre os resultados do método proposto e os do método de referência. Observação contrária pode ser feita em um dos níveis de recuperação do p,p'-DDT (0,35 mg.kg<sup>-1</sup>) e  $\gamma$ -HCH (0,45mg.kg<sup>-1</sup>) e em dois níveis do 4-nonilfenol (0,45 e 0,65 mg.kg<sup>-1</sup>), onde os valores de “*t<sub>cal</sub>*” foram superiores em relação ao valor de *t<sub>crítico</sub>*. As recuperações analíticas não satisfatórias para o p,p'-DDT,  $\gamma$ -HCH e 4-nonilfenol, podem estar associadas ao facto das concentrações avaliadas estarem muito próximos dos seus respectivos LOQ (0,26, 0,39 e 0,49 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente, excepto 0,65 mg kg<sup>-1</sup> para 4-nonilfenol). Contudo, pode-se verificar que na matriz da couve, em um total de 21 níveis de concentrações testadas (Tabela 6), as recuperações foram positivas em 18 (85,71%). Em particular, para todos os compostos, os dois adsorventes mostram a mesma eficiência em todas concentrações testadas excepto para o 4-nonilfenol, onde em três níveis de concentrações testadas, apenas um foi positivo (33,33%), mostrando diferenças na eficiência dos dois adsorventes para este composto. Por outro lado, na matriz do peixe (Tabela 7), dos 21 ensaios realizados, 17 (80,95%) não apresentam diferenças significativas entre as recuperações analíticas dos dois adsorventes. Apesar das diferenças estatísticas entre as médias das recuperações analíticas entre os adsorventes PSA e Mor-p, a metodologia pode ser validada uma vez que as recuperações analíticas na maioria dos níveis das concentrações testadas encontram-se dentro dos intervalos recomendados pela IUPAC e pela AOAC. Para o composto profenofos na matriz do peixe em particular, todas concentrações testadas apresentaram uma recuperação analítica abaixo dos padrões estabelecidos pela IUPAC e AOAC, o que significa que a metodologia não pode ser validada para este parâmetro nesta matriz.

Na avaliação da precisão do método em estudo, os valores das percentagens dos desvios-padrão relativos (%RSD) variaram de 1,58 a 12,14% na matriz da couve (Tabela 6). Na matriz do peixe (Tabela 7), as %RSD variaram de 1,21 a 9,02 %, estando todos abaixo de

20%. Segundo Ruiz e colaboradores (2010), na validação de um método analítico, a %RSD pode ser considerada aceitável até 20%.

#### **5.4 Teste de robustez**

A robustez do método em estudo pode ser avaliada pelos gráficos dos efeitos principais (Fig. 15) e pelo modelo de regressão linear (equação 15, secção 4.1). Para este parâmetro, os factores testados mostram uma influência significativa sobre os resultados da análise. Em ambos os casos verificou-se que a média das razões das áreas do anólito e da área do padrão interno ( $A/API$ ) aumenta com o aumento da velocidade da rotação do vórtex e mostra uma redução com o aumento do tempo de extracção e da quantidade do metanol. Em adição, dos gráficos dos efeitos principais e da equação de regressão, pode-se verificar que a extracção óptima foi conseguida na combinação de solventes 1% HAc em AcN:MeOH (90:10), velocidade da rotação do vórtex de 3200 rpm e tempo de extracção de 2 min. Estas condições foram fixadas para os ensaios experimentais subsequentes do trabalho.

#### **5.5 Selectividade dos adsorventes**

A selectividade dos dois adsorventes na limpeza do extracto foi avaliada a partir da adição da mistura de padrões em amostras brancas da couve e peixe, o que pode ser demonstrado pelos cromatogramas apresentados nas Figuras 16 (a) para PSA, 16 (b) para Mor-P, 17 (a) e 17 (b) para PSA e Mor-p, respectivamente. Neles, todos os picos dos compostos apresentam uma boa resolução com a excepção do pico da cipermetrina, onde, nas matrizes testadas para ambos os adsorventes, a sua intensidade foi menor comparativamente com a maioria dos componentes da matriz (co-extractos). Este teste indica que os adsorventes PSA e Mor-p são eficazes na etapa da limpeza dos extractos nas matrizes avaliadas.

## 5.6 Compostos orgânicos persistentes determinados nas amostras analisadas

Algumas variedades de pesticidas como os organoclorados, embora tenham sido banidos na agricultura moçambicana, os seus resíduos ainda persistem no meio ambiente. Este facto foi evidenciado pelos resultados da presente pesquisa, onde foram detectados e quantificados compostos desta classe. Lindane ( $\gamma$ -HCH), por exemplo, foi determinado em duas amostras de couve colhidas na região do Infulene (provincia de Maputo) em concentrações que variaram de  $0,475 \pm 0,056$  a  $0,642 \pm 0,156$  mg kg<sup>-1</sup> (Tabela 8), inferiores ao limite máximo residual permitido (LMR) fixado pela Codex Alimentarius database em 1 mg kg<sup>-1</sup> para matrizes vegetais. No entanto, os resultados deste estudo foram superiores aos reportados por Nuapia *et al.* (2016) que obtiveram  $\gamma$ -HCH em concentração de  $0,0997 \pm 0,0032$  mg kg<sup>-1</sup> em amostras de matriz vegetal (repolho), colectadas na República da África do Sul (RSA). Por outro lado, a concentração obtida no presente estudo esteve abaixo da concentração máxima de 0,9 mg kg<sup>-1</sup> obtida por Amoah e colaboradores (2006) em amostras de repolho colectadas em Gana (Tabela 11). Ainda neste estudo, o  $\gamma$ -HCH foi obtido em duas amostras de peixe, uma da espécie peixe-gato colhida no distrito de Larde (provincia de Nampula) e outra na espécie tilápia colhida na Cidade de Tete (Tabela 10), em concentrações de  $0,213 \pm 0,061$  e  $0,246 \pm 0,070$  mg kg<sup>-1</sup> respectivamente, valores acima do LMR fixado em 0,01 mg kg<sup>-1</sup>. Por sua vez, estes valores são superiores quando comparados com os reportados na RSA por Nuapia *et al.* (2016) em concentração de  $0,1058 \pm 0,0052$  mg kg<sup>-1</sup> em matriz similar.

A par do  $\gamma$ -HCH o seu isómero  $\beta$ -HCH foi encontrado em uma das amostras de repolho colhida no distrito de Boane (provincia de Maputo) na concentração de  $1,61 \pm 0,16$  mg kg<sup>-1</sup> (Tabela 9), este valor é superior ao LMR. Além disso, a concentração de  $\beta$ -HCH observada neste estudo é superior a  $0,002$  mg kg<sup>-1</sup> reportado por Oyeyiola e colaboradores (2017) em amostras de matriz semelhante, colhidas na Nigéria (Tabela 11).

Em adição aos isómeros do hexaclorobenzeno, o p,p'-DDD foi determinado em cinco amostras de couve, quatro colhidas na região do Infulene e uma no distrito da Moamba (provincia de Maputo) em concentrações que variaram de  $0,318 \pm 0,017$  a  $2,03 \pm 0,003$  mg kg<sup>-1</sup>. Ainda nesta pesquisa o p,p'-DDD foi quantificado em uma amostra de repolho no valor de  $0,782 \pm 0,024$  mg kg<sup>-1</sup>. Adicionalmente, o p,p'-DDD também foi quantificado em uma amostra de peixe tilápia colhida no distrito de Boane em concentração de  $0,195 \pm 0,026$  mg

kg<sup>-1</sup>. A par do p,p'-DDD, o seu precursor p,p'-DDT também foi obtido em uma amostra de couve da região do Infulene, na concentração de 0,364 ± 0,008 mg kg<sup>-1</sup> e em uma de repolho colhida em Boane, na concentração de 0,733 ± 0,013 mg kg<sup>-1</sup>, conforme as Tabelas 8 e 9. Para os dois compostos, as concentrações estiveram acima do LMR que é fixado em 0,05 mg.kg<sup>-1</sup> pela Codex Alimentarius para a matriz vegetal e 0,2 mg kg<sup>-1</sup> para os peixes.

Os mesmos resultados também estiveram acima dos reportados por Ko e colaboradores, (2012), em uma concentração de 0,141 mg kg<sup>-1</sup> para p,p'-DDD em amostras de repolho colhidas no Gana. Por sua vez, a concentração de p,p'-DDD obtida em amostras de peixe no presente estudo está acima dos valores 0,0097 ± 0,0045 a 0,0283 ± 0,0058 mg kg<sup>-1</sup> reportados na Coreia do Sul por Choi e colaboradores (2016) e 0,1027 mg kg<sup>-1</sup> obtida na Turquia por Topal e Onac (2020).

Na presente pesquisa, de uma forma geral, a concentração de p,p'-DDT obtida foi superior a 0,1259 ± 0,0059 mg kg<sup>-1</sup> reportada por Nuapia *et al.*, (2016), em amostras de repolho colectadas na RSA. Por outro lado, a concentração do p,p'-DDT deste estudo está dentro do intervalo 0,02 – 0,9 mg kg<sup>-1</sup>, concentrações obtidas por Ko e colaboradores (2012) em amostras semelhantes colectadas no Gana.

Em Moçambique, p,p'-DDT e o hexaclorobenzeno (β-HCH e γ-HCH) estão na lista de pesticidas proibidos. Assim, a sua detecção nas amostras do presente estudo pode estar relacionada com o uso ilegal ou com a sua baixa taxa de degradação no meio ambiente. Por outro lado, pode ser originário dos rios contaminados por esses compostos vindos de países vizinhos como a República da África do Sul e a República da Zâmbia, onde se pratica uma agricultura mecanizada mais intensiva. Segundo WHO (2003b), alguns compostos como o DDT ainda são usados legal ou ilegalmente em diferentes países e essa constitui uma das razões da sua detecção no meio ambiente.

Uma vez que a concentração de p,p'-DDD determinada nesta pesquisa foi superior à concentração do p,p'-DDT, esta tendência pode ser indicadora do processo de degradação anaeróbica do p,p'-DDT. De acordo com Sudharshan e colaboradores (2012), um dos produtos deste processo é o p,p'-DDD, um metabólito também com o tempo de vida muito longo. Neste ponto de vista, a detecção do p,p'-DDT e p,p'-DDD para além do uso ilegal, pode estar relacionada com o uso excessivo de p,p'-DDT no passado e não necessariamente uma aplicação recente.

Na presente pesquisa, a cipermetrina foi quantificada em uma amostra de repolho colhida no distrito de Boane (província de Maputo) na concentração de  $0,720 \pm 0,011 \text{ mg kg}^{-1}$ . Este valor está abaixo do LMR estabelecido em  $1 \text{ mg.kg}^{-1}$  para a matriz de repolho. Por outro lado, a concentração obtida neste estudo esteve acima da reportada por Jia e colaboradores (2012) em amostras de repolho colectadas na China onde obtiveram  $0,169 \text{ mg kg}^{-1}$ . Em outro estudo, Alamgir e colaboradores (2013) obtiveram  $0,052 \text{ mg kg}^{-1}$ , também inferior em relação à concentração obtida no presente estudo.

A presença deste insectecida na amostra do repolho analisado pode estar relacionada com aplicações excessivas durante a produção desta cultura por parte dos agricultores. Uma vez que o repolho é um dos vegetais mais vulnerável ao ataque das pragas, a sua produção tem exigido uma pulverização frequente de pesticidas durante a fase do crescimento.

O 4-nonilfenol (4NP) foi quantificado em uma amostra de repolho colhida no Infulene na concentração de  $0,191 \pm 0,013 \text{ mg kg}^{-1}$  (Tabela 9) e em quatro amostras de peixe, duas do peixe-gato, onde uma foi colhida na Matola e outra em Larde, duas do peixe tilápia das quais uma foi colhida no distrito de Larde e outra em Tete, onde as concentrações variaram de  $0,439 \pm 0,014$  a  $1,16 \pm 0,12 \text{ mg kg}^{-1}$  (Tabela 10). As concentrações de 4NP determinadas na presente pesquisa foram superiores às reportadas por Luo e colaboradores (2017), que obtiveram uma média de  $0,696 \text{ mg kg}^{-1}$  em diferentes produtos alimentares colectados na China. Contudo, os valores da concentração do 4NP em amostras do peixe desta pesquisa estão dentro do intervalo dos reportados por Akhbarizadeh e colaboradores (2021), que detectaram 4NP com uma concentração máxima de  $18,80 \text{ mg kg}^{-1}$  em amostras de peixe colectadas no Irão (Tabela 11). Na literatura, os LMRs para 4NP em vegetais e peixes não foram encontrados. O 4NP é um composto considerado “EDC” emergente e de acordo com Council (2007) os LMRs para este composto ainda não foram estabelecidos para as diferentes matrizes, excepto para água onde foi fixado em  $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$ .

O profenofos foi encontrado em uma amostra de couve colhida no distrito de Angónia (província de Tete) na concentração de  $2,07 \pm 0,34 \text{ mg kg}^{-1}$  e em duas de repolho uma obtida no distrito de Boane e outra na região do Infulene, nas concentrações de  $4,97 \pm 0,36$  e  $6,20 \pm 0,69 \text{ mg kg}^{-1}$  respectivamente conforme as Tabelas 8 e 9. Nas duas matrizes, as concentrações estiveram acima do LMR, que foi fixado em  $1 \text{ mg.kg}^{-1}$  para ambas matrizes. Estes valores também foram superiores em relação aos obtidos por Wanwimolruk e colaboradores, (2015)

em amostras de couve colectadas na Tailândia, onde as concentrações variaram de 0,005 a 0,183 mg kg<sup>-1</sup>. Por outro lado, Shi e colaboradores, (2021), em amostras de repolho colectadas na China (Tabela 11) determinaram profenofos com a concentração máxima de 0,0047 mg kg<sup>-1</sup>.

Estes resultados revelaram maior concentração do profenofos em vegetais comercializados em Moçambique comparativamente aos outros dois países (Tailândia e China). Esta acumulação pode estar associada ao intenso uso deste insectida na agricultura Moçambicana, visto que é um dos insectidas de utilização autorizada devido à sua baixa persistência ambiental. Apesar dessa vantagem ambiental, a sua ingestão excessiva pode causar problemas de saúde como alteração do funcionamento de processos metabólicos e degradação dos rins (Mogda *et al.*, 2009).

### **5.7 Avaliação do risco à saúde do consumidor**

Como critério para a avaliação do risco para a saúde do consumidor destes alimentos contaminados teve-se em conta que os consumidores da couve, repolho e peixe de águas frescas (doce) vendidos em mercados moçambicanos são sujeitos ao mesmo nível de exposição independentemente das suas idades. Assim, os índices de perigo de saúde associados ao consumo de vegetais foram calculados para cada pesticida, tanto para pessoas adultas assim como em crianças (ilustração 25C2 em anexo), os quais variaram de 0,012 a 0,709 para pessoas adultas e de 0,047 a 2,83 para crianças no consumo da couve. Para o consumo de repolho, os valores de HI variaram de 0,023 a 0,506 para adultos e de 0,093 a 2,02 para crianças. Relativamente ao consumo de peixe (ilustração 26C3 em anexo), os valores de HI variaram de 0,008 a 0,020 para os adultos e de 0,031 a 0,079 para crianças. Todos estes valores foram menores que um (1), excepto p,p'-DDD com 2,83 e 2,02 para crianças consumidoras da couve e repolho, respectivamente (Figura 19). Este parâmetro mostrou ausência de perigo para a saúde dos consumidores destes alimentos devido à acção individual para todos os pesticidas em todas as idades, excepto o p,p'-DDD, o qual pode afectar a saúde das crianças consumidoras da couve e repolho. Segundo Nuapia e colaboradores (2016), Oyeyiola e colaboradores (2017), em concordância com Shalaby e colaboradores (2021), quando o HI for menor que 1, tal revela uma concentração desse contaminante no alimento abaixo do nível tóxico para o consumidor.

De uma forma geral, os resultados desta pesquisa demonstram a presença de contaminantes pesquisados em couve, repolho e peixes vendidos em mercados moçambicanos. A avaliação de HI indica que em 90,91% das amostras analisadas apresentam concentrações abaixo dos níveis de toxicidade para todas as idades. Embora os resultados individuais de cada composto não mostram perigo de exposição, a sua presença simultânea no alimento pode colocar em risco a saúde dos consumidores. Este facto é demonstrado pelos índices de perigo (Figura 18) e pelos valores de PTI de 31,83 para couve, 37,50 para repolho e 23,98 para peixe (ilustração 24C1 em anexo), todos maiores que 1.

Os resultados do potencial de toxicidade e do índice de à saúde devido ao consumo dos vegetais e peixes vendidos nos mercados Moçambicanos, revelam um maior risco à saúde, uma vez que estes compostos podem acumular-se nos organismos dos consumidores destes alimentos. Estudos toxicológicos relacionam o consumo de alimentos contaminados por pesticidas e 4-nonilfenol com os diversos problemas de saúde pública como alteração do funcionamento do sistema endócrino, diversos tipos de cancro, defeitos congénitos, doença cardiovascular, menopausa precoce, desenvolvimento embrionário defeituoso, infertilidade, entre outros (Collotta, Bertazzi e Bollati, 2013; Grung *et al.*, 2015; Trueblood *et al.*, 2016; Monneret, 2017).

Em termos comparativos, as amostras da província de Maputo apresentam altos níveis de contaminação, seguidas das amostras da província de Nampula e Tete. Deste modo, os níveis mais baixos de contaminação foram observados na província de Tete. Estas diferenças podem estar relacionadas com a produção agrícola intensiva com recurso a pesticidas na província de Maputo.

Por outro lado, a acumulação destes compostos na província de Maputo pode ser associada à sua localização geográfica, que a permite uma partilha de rios com dois países vizinhos potencialmente agrícolas (a República da África do Sul e o Reino da Swazilândia). Segundo De Resende (2002) quando um contaminante é depositado em um curso de águas dinâmicas como rios, pode propagar-se em toda sua extensão e atingir regiões distantes da sua origem.

## 6 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

### 6.1 Conclusões

A partir dos resultados do presente estudo pode-se verificar que o método foi otimizado e validado tendo as condições óptimas da extracção fixadas na combinação do solvente 1% HAc em AcN:MeOH (90:10), velocidade de agitação em vórtex em 3200 rpm e tempo de extracção em 2 min. O coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ) variou de 0.9706 a 0.9920 na matriz da couve e no peixe de 0.9826 a 0.9999. As recuperações analíticas também variam de 69 a 114% na couve e 58 a 110% para o peixe.

Na matriz da couve a precisão do método (%RSD) variou de 1.58 a 12.14%, o limite de detecção (LOD) possui o valor máximo de 0.16 mg.kg<sup>-1</sup> e o limite de quantificação (LOQ) o valor mais baixo (0.25 mg.kg<sup>-1</sup>). Na matriz do peixe a precisão do método variou de 1.21 a 9.02%, o valor máximo de LOD é de 0.04 mg.kg<sup>-1</sup> e o menor LOQ de 0.02 mg.kg<sup>-1</sup>. Portanto, a proteína da semente da moringa pode ser utilizada como adsorvente alternativo ao adsorvente comercial amina secundária primária (PSA) na fase de limpeza de extractos de vegetais e peixes, excepto para determinação do profenofos na matriz do peixe.

Os resultados das análises de amostras demonstram a presença de compostos com um potencial efeito na desregulação do sistema endócrino como  $\beta$ -HCH,  $\gamma$ -HCH, cipermetrina, p,p'-DDD, p,p'-DDT, 4-nonilfenol e profenofos em legumes e peixes vendidos em mercados moçambicanos, alguns em concentração acima dos limites máximos residuais permitidos. A avaliação da estimativa do risco de exposição a estes compostos feita neste trabalho demonstrou que a presença de vários resíduos destes contaminantes no mesmo alimento constitui um perigo à saúde dos consumidores, com os índices do potencial de toxicidade maiores que 1, estimados em 31.8, 37.5 e 24.0 em amostras de couve, repolho e peixe, respectivamente. Para estes valores elevados, a província de Maputo teve maior contribuição, seguida da província de Nampula, sendo a província de Tete a de menor contribuição.

## **6.2 Recomendações**

A partir dos resultados da presente pesquisa recomenda-se:

- ❖ Às autoridades reguladoras do sector da agricultura, a intensificação de programas de sensibilização aos agricultores, que visem a divulgação de procedimentos das boas práticas agrícolas;
- ❖ Aos serviços de inspecção, a realização regular da fiscalização de forma a evitar possível uso de pesticidas proibidos;
- ❖ Aos pesquisadores e às autoridades competentes a cooperar em trabalhos de pesquisa, que visam o monitoramento destes poluentes e outros EDCs como biftalatos no meio ambiente e em produtos alimentares.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abass, K.; Reponen, P.; Jalonen, J. e Pelkonen, O. (2007). *In vitro metabolism and interaction of profenofos by human, mouse and rat liver preparations*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 87(3), 238–247. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2006.08.002>
- Akhbarizadeh, R.; Russo, G.; Rossi, S.; Golianova, K.; Moore, F.; Guida, M. e Grumetto, L. (2021). *Emerging endocrine disruptors in two edible fish from the Persian Gulf: Occurrence, congener profile, and human health risk assessment*. Marine Pollution Bulletin, 166, 112241. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112241>
- Alamgir, Z. C. M.; Fakhruddin, A. N. M.; Nazrul Islam, M.; Moniruzzaman, M.; Gan, S. H. e Khorshed A. M. (2013). *Detection of the residues of nineteen pesticides in fresh vegetable samples using gas chromatography-mass spectrometry*. Food Control, 34(2), 457–465. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.05.006>
- Ali, N.; Khan, S.; Khan, M. A.; Waqas, M. e Yao, M. (2019). *Endocrine disrupting pesticides in soil and their health risk through ingestion of vegetables grown in Pakistan*. Environmental Science and Pollution Research 26:8808–8820 <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04287-y>
- Amoah, P.; Drechsel, P.; Abaidoo, R. C. e Ntow, W. J. (2006). *Pesticide and Pathogen Contamination of Vegetables in Ghana ' s Urban Markets*. 6, 1–6. <https://doi.org/10.1007/s00244-004-0054-8>
- AOAC (2016). *Guidelines for Standard Method Performance Requirements*. Official Methods of Analysis. Appendix F, p. 9
- Bhardwaj, S. K.; Dwivedi, K. e Agarwal, D. D. (2016). *A Review : HPLC Method Development and Validation ISSN-2231-5012 Review Article A Review : HPLC Method Development and Validation*. International Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry, 5 76–81.
- Bhanu, A. P. e Deepak, M. (2015). *Toxicity Of Cypermethrin On The Serum Enzymes In The Freshwater Fish Cyprinus Carpio ( LINN .)*. Journal of Entomology and Zoology Studies

3 (1): 126-128

- Bano, M. e Bhatt, D.K., (2007). *Neuroprotective Role of a Novel Combination of Certain Antioxidants on Lindane (  $\gamma$ -HCH ) Induced Toxicity in Cerebrum of Mice*. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 3(6): 664-669
- Bernabeu, M. L. S.; Ruiz, P. J. U; Martínez, M. S.; Cánovas, M.J. M.; Lopez, C. M. e López, R. (2016). *Análisis de ftalatos en detergentes y limpiadores por dos métodos analíticos*. Revista de Salud Ambiental, 16(16), 6–12.
- Boes, E.; Rosmalina, R. T.; Ridwan, Y. S.; Nugraha, W. C. e Yusiasih, R. (2015). *Development of Validated Method Using QuEChERS Technique for Organochlorine Pesticide Residues in Vegetable*. Procedia Chemistry, 16, 229–236. <https://doi.org/10.1016/j.proche.2015.12.052>
- Bornman, M. S.; Aneck-Hahn, N. H.; De Jager, C.; Wagenaar, G. M.; Bouwman, H.; Barnhoorn, I. E. J. e Heindel, J. J. (2017). *Endocrine disruptors and health effects in Africa: A call for action*. Environmental Health Perspectives, 125(8), 085005-1-085005–085010. <https://doi.org/10.1289/EHP1774>
- Brito, N. M.; De Amarante, J. O. P.; Polese, L. e Ribeiro, M. L. (2003). *Validação De Métodos Analíticos: Estratégia E Discussão. Pesticidas*: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente, 13, 129–146. <https://doi.org/10.5380/pes.v13i0.3173>
- Canonico, G. C.; Arthington, A.; Mccrary, J. K. e Thieme, M. L. (2005). *The effects of introduced tilapias on native biodiversity*. Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems, 15(5), 463–483. <https://doi.org/10.1002/aqc.699>
- Capobiango, H. L. V. e Cardeal, Z. L. (2005). *A solid-phase microextraction method for the chromatographic determination of organophosphorus pesticides in fish, water, potatoes, guava and coffee*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 16(5), 907–914. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532005000600004>
- Carneiro, R. P.; Oliveira, F. A. S.; Madureira, F. D.; Silva, G.; De Souza, W. R. e Lopes, R. P. (2013). *Development and method validation for determination of 128 pesticides in bananas by modified QuEChERS and UHPLC-MS/MS analysis*. Food Control, 33(2),

413–423. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.02.027>

Cartea, M. E.; Profile, S.; Lema, M.; Francisco, M. e Velasco, P. (2011). Basic information on vegetables Brassica crops View project. *Genetics, Genomics and Breeding of Vegetable Brassicas*. 1–33. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/235679974>

Chadha, P.; Sharma, M. e Madhu Sharma, C. (2018). *Toxicity of non-ionic surfactant 4-nonylphenol an endocrine disruptor: A review* International Journal of Fisheries and Aquatic Studies 6(2): 190-197 Toxicity of non-ionic surfactant 4-nonylphenol an endocrine disruptor: A review. *Ijfas*, 6(2), 190–197. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/324029846>

Chaikasem, S. e Roi-et, V. N. (2020). *Applied Environmental Research Health Risk Assessment of Pesticide Residues in Vegetables from River Basin Area*. *App. Envi. Res.* 42(2) (2020): 46-61. <https://doi.org/10.35762/AER.2020.42.2.4>

Chen, M.; Cao, F., Li, F.; Liu, C.; Tong, H.; Wu, W. e Hu, M. (2013). *Anaerobic Transformation of DDT Related to Iron(III) Reduction and Microbial Community Structure in Paddy Soils*. *J. Agric. Food Chem.* 61, 2224–2233. <https://dx.doi.org/10.1021/jf305029p>

Choi, M.; Lee, I. S. e Jung, R. H. (2016). *Rapid determination of organochlorine pesticides in fish using selective pressurized liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry*. *Food Chemistry*, 205, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.156>

Codex Alimentarius. World Food Safety Day (2022). Online Databases. <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/pesticides/en/>. Accessed 21.07.2022

Collotta, M.; Bertazzi, P. A. e Bollati, V. (2013). *Epigenetics and pesticides*. *Toxicology*, 307, 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2013.01.017>

Combarous, Y. (2017). *Endocrine Disruptor Compounds (EDCs) and agriculture: The case of pesticides*. *Comptes Rendus - Biologies*, 340(9–10), 406–409. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2017.07.009>

Costa-Pierce, B. A. (2003). *Rapid evolution of an established feral tilapia (Oreochromis*

- spp.*): *The need to incorporate invasion science into regulatory structures*. *Biological Invasions*, 5(1–2), 71–84. <https://doi.org/10.1023/A:1024094606326>
- Costa, G. H. G.; De Freitas, C.M.; Mendes, F. Q. e Mutton, M. J. R. (2016). *Extrato de sementes de moringa como floculante de caldo de cana-de-açúcar*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 51(10), 1794–1798. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2016001000012>
- Costa, N. O.; Vieira, M. L.; Sgarioni, V.; Pereira, M. R. F.; Montagnini, B. G.; Mesquita, S. de F. P. e Gerardin, D. C. C. (2015). *Evaluation of the reproductive toxicity of fungicide propiconazole in male rats*. *Toxicology*, 335, 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2015.06.011>
- Council, O. F. T. H. E. (2007). *Water environmental quality standards*. *CONCAWE Review*, 16(1), 11–14.
- Diamanti-Kandarakis, E.; Bourguignon, J. P.; Giudice, L. C.; Hauser, R.; Prins, G. S.; Soto, A. M. e Gore, A. C. (2009). *Endocrine-disrupting chemicals: An Endocrine Society scientific statement*. *Endocrine Reviews*, 30(4), 293–342. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0002>
- De Oliveira, L. G.; Kurza, M. H. S.; Guimarães, M. C. M.; Martinsa, M. L.; Prestes, O. D.; Zanella, R.; Ribeiro, J. N. S. e Gonçalves, F. F. (2019). *Development and validation of a method for the analysis of pyrethroid residues in fish using GC–MS*. *Food Chemistry* 297, 124944 <http://dx.doi.org/10.1016/j.foochem.2019.06.011>
- De Resende, A. V. (2002). *Água: Contaminação da Água*. 28. Retrieved from [http://www.cpac.embrapa.br/publicacoes/search\\_pbl/1?q=Qualidade da água](http://www.cpac.embrapa.br/publicacoes/search_pbl/1?q=Qualidade da água)
- Eddleston, M.; Worek, F.; Eyer, P.; Thiermann, H.; Von Meyer, L.; Jeganathan, K. e Buckley, N. A. (2009). *Poisoning with the S-Alkyl organophosphorus insecticides profenofos and prothiofos*. *Qjm*, 102(11), 785–792. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hcp119>
- Ejere, V. C.; Adeniji, A. O.; Levi, C. A.; Asogwa, C. N. e Chukwuka, C. O. (2014). *Evaluation of Poultry Feather Meal as a Dietary Protein Source for Clarias Gariepinus and Heterobranchus Bidorsalis Hybrid 2 . 6 Determination of Growth Performance of*

- Heteroclaris species Fed with Different Inclusions of Feather meal* . International Journal of Science and Technology, 3(4), 203–208. Retrieved from [http://www.journalofsciencetechnology.vol\\_3\\_no\\_4/951672138199626](http://www.journalofsciencetechnology.vol_3_no_4/951672138199626)
- El-Husseiny, O. M.; Hassan, M. I.; El-Haroun, E. R. e Suloma, A. (2018). *Utilization of poultry by-product meal supplemented with L-lysine as fish meal replacer in the diet of African catfish Clarias gariepinus (Burchell, 1822)*. Journal of Applied Aquaculture, 30(1), 63–75. <https://doi.org/10.1080/10454438.2017.1412844>
- European Environment Agency (EEA). (2019). *Effects of Endocrine-disrupting Chemical Exposure on Zebrafish Ovarian Follicles*. St. John Fisher College, Rochester, NY 14618
- 53(9), 1689–1699. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Farina, Y.; Abdullah, P.; Bibi, N.; Mohd, W.; Wan, A.e Khalik, M. (2016). *Determination of Pesticide Residues in Leafy Vegetables at Parts per Billion Levels by a Chemometric Study Using GC&#x02013;ECD in Cameron Highlands, Malaysia*. Food Chemistry. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.113>
- Ferreres, F.; Sousa, C.; Valentão, P.; Seabra, R. M.; Pereira, J. A. e Andrade, P. B. (2007). *Tronchuda cabbage (Brassica oleracea L. var. costata DC) seeds: Phytochemical characterization and antioxidant potential*. Food Chemistry, 101(2), 549–558. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.02.013>
- Firmat, C.; Alibert, P.; Mutin, G.; Losseau, M.; Pariselle, A. e Sasal, P. (2016). *A case of complete loss of gill parasites in the invasive cichlid Oreochromis mossambicus*. Parasitology Research, 115(9), 3657–3661. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5168-1>
- Freire, J. E. C.; Vasconcelos, I. M.; Moreno, F. B. M. B.; Batista, A. B.; Lobo, M. D. P., Pereira, M. L. e Grangeiro, T. B. (2015). *Mo-CBP3, an antifungal chitin-binding protein from Moringa oleifera seeds, is a member of the 2S albumin family*. PLoS ONE, 10(3), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119871>
- Gbeddy, G.; Yeboah, P.; Carboo, D.; Doamekpor, L.; Afful, S.; Nartey, V. e Egbi, C. (2012). *Organochlorine pesticide residues in African catfish muscle , Nile tilapia Muscle and gills from the middle Volta basin , Kpando Torkor , Ghana and their potential health*

*risks to humans*. Elixir Agriculture 49 (2012) 9724-9730.

Giulivo, M.; Lopez de Alda, M.; Capri, E. e Barceló, D. (2016). *Human exposure to endocrine disrupting compounds: Their role in reproductive systems, metabolic syndrome and breast cancer*. A review. Environmental Research, 151, 251–264. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.07.011>

Grob, R. L. e Barry, E. F. (2005). *Modern Practice of Gas Chromatography*. Fourth edition, Vol. 42. John Wiley e Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. 182-184 pp

Grung, M., Lin, Y.; Zhang, H.; Steen, A. O.; Huang, J.; Zhang, G. e Larssen, T. (2015). *Pesticide levels and environmental risk in aquatic environments in China - A review*. Environment International, 81, 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.04.013>

Haber, L. L.; Ecole, C. C. ; Bowen, W. e Resende, F. V. (2015). *Horticultura em Moçambique: Características, Tecnologias de Produção e de Pós-Colheita*. [ISBN 978-85-7035-515-71], Embrapa-Brasília, 276 p

Hayes, T. B.; Case, P.; Chui, S., Chung, D.; Haeffele, C.; Haston, K. e Tsui, M. (2006). *Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: Are we underestimating the impact?* Environmental Health Perspectives, 114(SUPPL.1), 40–50. <https://doi.org/10.1289/ehp.8051>

Hejji L.; Azzouz A.; Colon L. P.; Souhail B. e Ballesteros E., (2020). *A multi-residue method for determining twenty-four endocrine disrupting chemicals in vegetables and fruits using ultrasound-assisted solid-liquid extraction and continuous solid-phase extraction*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128158>

Hocine, L.; Merzouk, H.; Merzouk, S. A.; Ghorzi, H.; Youbi, M. e Narce, M. (2016). *The effects of alpha-cypermethrin exposure on biochemical and redox parameters in pregnant rats and their newborns*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 134, 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2016.04.007>

Imai, K.; Yoshinaga, J.; Yoshikane, M.; Shiraiishi, H.; Mienoc, M. N.; Yoshiike, M., Nozawa, S. e Iwamoto, T. (2014). *Pyrethroid insecticide exposure and semen quality of young Japanese men*. Reproductive Toxicology 43, 38–44

<http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.10.010>

Jia, F.; Wang, W.; Wang, J.; Yin, J.; Liu, Y. e Liu, Z. (2012). *New strategy to enhance the extraction efficiency of pyrethroid pesticides in fish samples using a modified QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) method*. *Analytical Methods*, 4(2), 449–453. <https://doi.org/10.1039/c2ay05681j>

Kamal, A. H. M. M. e Mair, G. C. (2005). *Salinity tolerance in superior genotypes of tilapia, Oreochromis niloticus, Oreochromis mossambicus and their hybrids*. *Aquaculture*, 247(1–4), 189–201. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.02.008>

Kariathi, V.; Kassim, N. e Kimanya, M. (2016). *Pesticide exposure from fresh tomatoes and its relationship with pesticide application practices in Meru district*. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1), 1–12. <https://doi.org/10.1080/23311932.2016.1196808>

Ko, C.; Buah-kwo, A.; Enimil, E.; Blewu, B. e Agyei-martey, G. (2012). *Residues of organochlorine pesticides in vegetables marketed in Greater Accra Region of Ghana*. 25. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.11.035>

Kumari, B.; Kumar, R. e Kathpal, T. S. (2001). *An Improved Multiresidue Procedure for Determination of Pesticides in Vegetables*. *Pesticide Research Journal* Vol. 13 (1) : 32-35.

Kushwaha, M.; Verma, S. e Chatterjee, S. (2016). *Profenofos, an Acetylcholinesterase-Inhibiting Organophosphorus Pesticide: A Short Review of Its Usage, Toxicity, and Biodegradation*. *Journal of Environmental Quality*, 45(5), 1478–1489. <https://doi.org/10.2134/jeq2016.03.0100>

Le Thi Minh, T.; Nguyen Phuoc, D.; Dinh Quoc, T.; Ngo, H. H. e Do Hong Lan, C. (2016). *Presence of e-EDCs in surface water and effluents of pollution sources in Sai Gon and Dong Nai river basin*. *Sustainable Environment Research*, 26(1), 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.serj.2015.09.001>

Lehotay, S. J.; Ae, K., Kwon, H.; Koesukwiwat, U., Fu, W., Mastovska, K. e Leepipatpiboon, N. (2010). *Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables* & *Journal of Chromatography A*, 1217(16),

2548–2560. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.01.044>

- Liu, Y.; Dai, X. e Wei, J. (2013). Toxicity of the xenoestrogen nonylphenol and its biodegradation by the alga *Cyclotella caspia*. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 25(8), 1662–1671. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(12\)60182-X](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(12)60182-X)
- Luo, L.; Yang, Y.; Wang, Q.; Li, H. ;pu Luo, Z. fei Qu, Z.; peng; Yang, e Guang Z. (2017). Determination of 4-n-octylphenol, 4-n-nonylphenol and bisphenol A in fish samples from lake and rivers within Hunan Province, China. *Microchemical Journal*, 132, 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.01.012>
- Lyons, R. A. e Benvenuti, L. (2016). *Deposition and Distribution Factors for the Endocrine Disruptor, 4-Nonylphenol, in the Sierra Nevada Mountains, California, USA*. *Journal of Environmental & Analytical Toxicology*, 6(4). <https://doi.org/10.4172/2161-0525.1000388>
- Madaj, R.; Sobiecka, E. e Kalinowska, H. (2018). *Lindane, kepone and pentachlorobenzene: chloropesticides banned by Stockholm convention*. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 15(2), 471–480. <https://doi.org/10.1007/s13762-017-1417-9>
- Maddern, M. G.; Morgan, D. L. e Gill, H. S. (2007). *Distribution, diet and potential ecological impacts of the introduced Mozambique mouthbrooder *Oreochromis mossambicus* Peters (Pisces: Cichlidae) in Western Australia*. *Journal of the Royal Society of Western Australia*, 90(4), 203–214.
- Madrona, G. S.; Bergamasco, R.; Seolin, V. J. e Fagundes Klen, M. R. (2011). *The potential of different saline solution on the extraction of the *Moringa oleifera* seed's active component for water treatment*. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, 9. <https://doi.org/10.1515/1542-6580.2511>
- Mahboob, S.; Niazi, F.; AlGhanim, K.; Sultana, S.; Al-Misned, F. e Ahmed, Z. (2015). *Health risks associated with pesticide residues in water, sediments and the muscle tissues of *Catla catla* at Head Balloki on the River Ravi*. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187(3), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s10661-015-4285-0>

- Malhat, F. e Nasr, I. (2011). *Organophosphorus pesticides residues in fish samples from the River Nile tributaries in Egypt*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 87(6), 689–692. <https://doi.org/10.1007/s00128-011-0419-4>
- Manuelmolina-Ruiz, J.; Cieslik, E.; Cieslik, I. e Walkowska, I. (2014). *Determination of pesticide residues in fish tissues by modified QuEChERS method and dual-d-SPE clean-up coupled to gas chromatography–mass spectrometry*. Environmental Science and Pollution Research, 22(1), 369–378. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3361-2>
- Martínez-Lara, J. M. e Páez Melo, M. I. (2017). *Diseño de experimentos aplicado en la optimización del método de extracción QuEChERS para la determinación de plaguicidas organoclorados y organofosforados en suelos*. Revista Internacional de Contaminacion Ambiental, 33(4), 559–573. <https://doi.org/10.20937/RICA.2017.33.04.02>
- Matisová, E. e Hrouzková, S. (2012). *Analysis of endocrine disrupting pesticides by capillary GC with mass spectrometric detection*. In *International Journal of Environmental Research and Public Health (Vol. 9)*. <https://doi.org/10.3390/ijerph9093166>
- Mbabazi, J. (2011). *Principles and Methods for the Risk Assessment of Chemicals in Food*. International Journal of Environmental Studies, 68(2), 251–252. <https://doi.org/10.1080/00207233.2010.549617>
- Meira, A. P. G. (2015). *Vegetal : uma revisão Techniques of analysis for pesticide residue in plant foods : a review*. Segurança Alimentar e Nutricional, 22(2), 766–777. Retrieved from <https://periodicos.sbu.unicamp.br/ojs/index.php/san/article/viewFile/8642508/10029>
- Miao, J. ; Liu, A.; Wu, L.; Yu, M., Wei, W. e Liu. S. (2020). *Magnetic Ferroferric Oxide and Polydopamine Molecularly Imprinted Polymer Nanocomposites Based Electrochemical Impedance Sensor for the Selective Separation and Sensitive Determination of Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT)*. Analytica Chimica Acta 1095 82 e 92. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.10.027>
- Miller, J. N. e Miller, J. C. (2010). *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. Sixth edittion, London-England, 39-43 pp

- Mogda K. ;Mansour; Afaf A.I.; El-Kashoury, M. A. R. e K. M. K. (2009). *Oxidative and biochemical alterations induced by profenofos insecticide in rats*. *Nature and Science*, 7(2), 1–5.
- Molina-Ruiz, J.; Cieslik, E.; Cieslik, I. e Walkowska, I. (2014). *Determination of pesticide residues in fish tissues by modified QuEChERS method and dual-d-SPE clean-up coupled to gas chromatography–mass spectrometry*. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(1), 369–378. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3361-2>
- Monica, A.; Lopez, G.; Fussell, R. J.; Dominic, S.; Mike, R. e Ramesh, M. (2014). *Ac ce p te t*. *Journal of Chromatography A*. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.10.099>
- Monneret, C. (2017). *What is an endocrine disruptor?* *Comptes Rendus - Biologies*, 340(9–10), 403–405. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2017.07.004>
- Montes-Grajales, D. e Olivero-Verbel, J. (2020). *Structure-based Identification of Endocrine Disrupting Pesticides Targeting Breast Cancer Proteins*. *Toxicology*, 439(January), 152459. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2020.152459>
- Mumtaz, M.; Qadir, A.; Mahmood, A.; Mehmood, A.; Naseem, R., Li, J. e Zhang, G. (2015). *Human health risk assessment , congener speci fi c analysis and spatial distribution pattern of organochlorine pesticides ( OCPs ) through rice crop from selected districts of Punjab Province , Pakistan*. *Science of the Total Environment* 511, 354–361. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.12.030>
- Muranli, F. D. G. (2013). *Genotoxic and cytotoxic evaluation of pyrethroid insecticides  $\lambda$ -cyhalothrin and  $\alpha$ -cypermethrin on human blood lymphocyte culture*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 90(3), 357–363. <https://doi.org/10.1007/s00128-012-0909-z>
- Naidoo, S.; London, L.; Burdorf, A.; Naidoo, R.;Kromhout, H.; Scandinavian, S. e May, N. (2017). *Norwegian National Institute of Occupational Health Danish National Research Centre for the Working Environment Finnish Institute of Occupational Health Spontaneous miscarriages and infant deaths among female farmers in rural South Africa Institute of Occ.*

- Naqvi, T.; Warden, A. C.; French, N.; Sugrue, E.; Carr, P. D.; Jackson, C. J. e Scott, C. (2014). A 5000-fold increase in the specificity of a bacterial phosphotriesterase for malathion through combinatorial active site mutagenesis. *PLoS ONE*, 9(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094177>
- Nolan, K.; Kamrath, J.e Levitt, J. (2012). *Lindane toxicity: A comprehensive review of the medical literature*. *Pediatric Dermatology* Vol. 29 No. 2 141–146. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1470.2011.01519.x>
- Nuapia, Y.; Chimuka, L. e Cukrowska, E. (2016). *Assessment of organochlorine pesticide residues in raw food samples from open markets in two African cities*. *Chemosphere*, 164, 480–487. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.055>
- Odewale, G. O.; Sosan, M. B.; Oyekunle, J. A. O. e Adeleye, A. O. (2021). *Human health risk assessment of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) and hexachlorocyclohexane (HCH) pesticide residues in fruits and vegetables in Nigeria*. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(25), 33133–33145. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-12747-7>
- Okuda, T.; Baes, A. U.; Nishijima, W. e Okada, M. (2001). *Coagulation mechanism of salt solution-extracted active component in Moringa oleifera seeds*. *Water Research*, 35(3), 830–834. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00296-7](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00296-7)
- Olutona, G. e Livingstone, S. (2018). *Detection of Organochlorine Pesticide (OCPs) Residues and Trace Metals in Some Selected Malt Drinks in Nigeria*. *Beverages*, 4(3), 65. <https://doi.org/10.3390/beverages4030065>
- Omar, N.; Bakar, J. e Muhammad, K. (2013). *Determination of organochlorine pesticides in shrimp by gas chromatography-mass spectrometry using a modified QuEChERS approach*. *Food Control*, 34(2), 318–322. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.04.029>
- Omitoyin, B. O.; Ajani, E. K., Adesina, B. T. e Okuagu, C. N. F. (2006). *Toxicity of Lindane (Gamma Hexachloro - CycloHexane) to Clarias gariepinus (Burchell 1822)*. [ISSN: 1817-3098]. *International Digital Organization for Scientific Information* Volume 1 Number(1) : 57-63
- Ordás, A. e Cartea, M. E. (2007). *Cabbage and Kale. Vegetables I*, (1999), 119–149.

[https://doi.org/10.1007/978-0-387-30443-4\\_4](https://doi.org/10.1007/978-0-387-30443-4_4)

- Oyeyiola, A. O.; Fatunsin, T.; Akanbi, L. M.; Fadahunsi, D. E. e Moshood, O. (2017). *Human Health Risk of Organochlorine Pesticides in Foods Grown in Nigeria*. *J Health Pollution* 15: 63–70.
- Pandey, A. K.; Nagpure, N. S.; Trivedi, S. P.; Kumar, R.; Kushwaha, B. e Lakra, W. S. (2011). *Investigation on acute toxicity and behavioral changes in Channa punctatus (Bloch) due to organophosphate pesticide profenofos*. *Drug and Chemical Toxicology*, 34(4), 424–428. <https://doi.org/10.3109/01480545.2011.585650>
- Pereira, E. M.; Dantas, D.; Leite, D. F.; Lima, V. R. ;De Porto, R. M.; Isabel, M. e Barros, W. (2016). *Caracterização Físico-Química De Hortaliças Tipo Folha Comercializadas No Brejo Paraibano*, 37(1), 19–22. <https://doi.org/10.25066/agrotec.v37i1.29279>
- Pimpão, C. T.; Zampronio, A. R. e Silva de Assis, H. C. (2007). *Effects of deltamethrin on hematological parameters and enzymatic activity in Ancistrus multispinis (Pisces, Teleostei)*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88(2), 122–127. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2006.10.002>
- Płonka, M.; Walorczyk, S.; Miszczyk, M. e Kronenbach-Dylong, D. (2016). *Simultaneous gas chromatographic determination of chlorpyrifos and its impurity sulfotep in liquid pesticide formulations*. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 51(11), 736–741. <https://doi.org/10.1080/03601234.2016.1198637>
- Prestes, O. D.; Adaime, M. B. e Zanella, R. (2011). *QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos*. *Scientia Chromatographica*, 3(1), 51–64. <https://doi.org/10.4322/sc.2011.004>
- Quinn, L. P.; De Vos, B. J.; Fernandes-Whaley, M.; Roos, C.; Bouwman, H.; Kylin, H., Pieters, R. e Van Den Berg, J. (2011). *Pesticide Use in South Africa: One of the Largest Importers of Pesticides in Africa*. 53, 65-69pp
- Raslan, A. A.; Elbadry, S. e Darwish, W. S. (2018). *Estimation and human health risk assessment of organochlorine pesticides in raw milk marketed in Zagazig City, Egypt*.

Journal of Toxicology. <https://doi.org/10.1155/2018/3821797>

- Rejczak, T. e Tuzimski, T. (2015). *A review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation approach*. Open Chemistry, 13(1), 980–1010. <https://doi.org/10.1515/chem-2015-0109>
- Ribani, M.; Grespan Bottoli, C. B.; Collins, C. H.; Fontes Jardim, I. C. S. e Costa Melo, L. F. (2004). *Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos*. Quimica Nova, 27(5), 771–780. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000500017>
- Roelofs, M. J. E.; Temming, A. R.; Piersma, A. H.; van den Berg, M. e van Duursen, M. B. M. (2014). *Conazole fungicides inhibit Leydig cell testosterone secretion and androgen receptor activation in vitro*. Toxicology Reports, 1, 271–283. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.05.006>
- Ruiz, E.; Santillana, M. I.; Nieto, M. T.; Cirugeda, M. E. e Sánchez, J. J. (2010). *Determination of furan in jarred baby food purchased from the Spanish market by headspace gas chromatography-mass spectrometry (HS-GC-MS)*. Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment, 27(9), 1208–1214. <https://doi.org/10.1080/19440049.2010.489578>
- Rylander, L.; Rignell-Hydbom, A.; Tinnerberg, H. e Jönsson, B. A. G. (2014). *Trends in human concentrations of endocrine disruptors: Possible reasons and consequences*. Journal of Epidemiology and Community Health, 68(1), 4–5. <https://doi.org/10.1136/jech-2012-201508>
- Sayed, A. E. D. H.; Mahmoud, U. M. e Mekkawy, I. A. (2012). *Reproductive biomarkers to identify endocrine disruption in Clarias gariepinus exposed to 4-nonylphenol*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 78, 310–319. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.11.041>
- Schug, T. T.; Janesick, A.; Blumberg, B. e Heindel, J. J. (2011). *Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility*. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 127(3–5), 204–215. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2011.08.007>
- Shalaby, S. E. M.; Abdou, G. Y.; El-metwally, I. M. e Abou-elella, G. M. A. (2021). *Health*

*risk assessment of pesticide residues in vegetables collected from Dakahlia , Egypt.*  
Journal of Plant Protection Research, ISSN1427-4345.

<https://doi.org/10.24425/jppr.2021.137951>

Sharafeldin, K.; Abdel-Gawad, H.; Ramzy, E.; Sweilum, M. e Nagy, M. (2015). *Harmful impact of profenofos on the physiological parameters in Nile tilapia, Oreochromis niloticus.* International Journal of Basic and Applied Sciences, 4(1), 19.  
<https://doi.org/10.14419/ijbas.v4i1.3832>

Sharma, H.; Zhang, P.; Barber, D. S. e Liu, B. (2010). *Organochlorine pesticides dieldrin and lindane induce cooperative toxicity in dopaminergic neurons: Role of oxidative stress.* NeuroToxicology, 31(2), 215–222. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2009.12.007>

Sharma, P.; Tseng, H. H.; Lee, J. Y. L.; Tsai, E. M. e Suen, J. L. (2021). *A prominent environmental endocrine disruptor, 4-nonylphenol, promotes endometriosis development via plasmacytoid dendritic cells.* Molecular Human Reproduction, 26(8), 601–614.  
<https://doi.org/10.1093/MOLEHR/GAAA039>

Shem O. W. (2001). *Use and Distribution of Organochlorine Pesticides.* The future in Africa. Kenya National Academy of Sciences. Pure Appl. Chem., Vol. 73, No. 7, pp. 1147–1155

Shi, X.; Liu, H.; Zhang, M.; Yang, F.; Li, J.; Guo, Y. e Sun, X. (2021). *Ultrasensitive electrochemiluminescence aptasensor based on AuNPs@MWCNTs and Au@AgNPs for detection of profenofos residues.* Sensors and Actuators B: Chemical, 348(266), 130663.  
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.130663>

Silvina, N.; Verónica, C.; Julia, H.; Daniela, R.; Larissa, K.; Diana, K. e Michelangelo, A. (2013). *Análisis multiresiduo de 41 pesticidas en miel por LC-MS/MS: evaluación de dos métodos de clean-up.* Agrociencia Uruguay, 17(1), 101–107.  
<https://doi.org/10.2477/vol17iss1pp101-107>

Slama, R.; Vernet, C.; Nassan, F. L.; Hauser, R. e Philippat, C. (2017). *Characterizing the effect of endocrine disruptors on human health: The role of epidemiological cohorts.* Comptes Rendus - Biologies, 340(9–10), 421–431.

<https://doi.org/10.1016/j.crv.2017.07.008>

Skoog D.A.; Holler F.J. e Crouch S. R. (1998). *Principles of Instrumental Analyses*. Sixth Edition. Thomson Brooks/Cole, USA p782-793

Sousa, C.; Valentão, P.; Ferreres, F.; Seabra, R. M. e Andrade, P. B. (2008). *Tronchuda cabbage (Brassica oleracea L. var. costata DC): Scavenger of reactive nitrogen species*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56(11), 4205–4211. <https://doi.org/10.1021/jf072740y>

Sousa, C.; Valentão, P.; Rangel, J.; Lopes, G.; Pereira, J. A.; Ferreres, F. e Andrade, P. B. (2005). *Influence of two fertilization regimens on the amounts of organic acids and phenolic compounds of tronchuda cabbage (Brassica oleracea L. Var. costata DC)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(23), 9128–9132. <https://doi.org/10.1021/jf051445f>

Sudharshan, S.; Naidu, R.; Mallavarapu, M. e Bolan, N. (2012). *DDT remediation in contaminated soils: A review of recent studies*. Biodegradation, 23(6), 851–863. <https://doi.org/10.1007/s10532-012-9575-4>

Sultan, N. S.; Raipat, B. S. e Sinha, M. P. (2013). *Isolation and characterization of bacillus cereus strain JY9 and Methylobacterium sp. HJM27 and their growth kinetics studies in presence of pesticides*. Journal of Biopesticides, 6(1), 26–31.

Suvetha, L.; Ramesh, M. e Saravanan, M. (2010). *Influence of cypermethrin toxicity on ionic regulation and gill Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity of a freshwater teleost fish Cyprinus carpio*. Environmental Toxicology and Pharmacology, 29(1), 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2009.09.005>

Taveira, M.; Pereira, D. M.; Sousa, C.; Ferreres, F.; Andrade, P. B.; Martins, A. e Valentão, P. (2009). *In vitro cultures of Brassica oleracea L. var. costata DC: Potential plant bioreactor for antioxidant phenolic compounds*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57(4), 1247–1252. <https://doi.org/10.1021/jf803496x>

Thieu, T. T. (2015). *Effects of DDT on Environment and Human Health*. Journal of Education and Social Sciences, Vol. 2, ISSN 2289-9855

- Thompson, L. A.; Darwish, W. S.; Ikenaka, Y.; Nakayama, S. M. M.; Mizukawa, H. e Ishizuka, M. (2017). *Organochlorine pesticide contamination of foods in Africa: Incidence and public health significance. Journal of Veterinary Medical Science*, 79(4), 751–764. <https://doi.org/10.1292/jvms.16-0214>
- Topal, T. e Onac, C. (2020). *Determination of Heavy Metals and Pesticides in Different Types of Fish Samples Collected from Four Different Locations of Aegean and Marmara Sea. Journal of Food Quality*. <https://doi.org/10.1155/2020/8101532>
- Tripathy, V.; Saha, A.; Patel, D. J.; Basak, B. B.; Shah, P. G. e Kumar, J. (2016). *Validation of a QuEChERS-based gas chromatographic method for analysis of pesticide residues in Cassia angustifolia (senna). Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 51(8), 508–518. <https://doi.org/10.1080/03601234.2016.1170544>
- Trueblood, A. B.; Shipp, E.; Han, D.; Ross, J. e Cizmas, L. H. (2016). *Pesticide-related hospitalizations among children and teenagers in Texas, 2004–2013. Public Health Reports*, 131(4), 588–596. <https://doi.org/10.1177/0033354916662218>
- Ullah, S.; Zuberi, A.; Alagawany, M.; Farag, M. R.; Dadar, M.; Karthik, K. e Iqbal, H. M. N. (2018). *Cypermethrin induced toxicities in fish and adverse health outcomes: Its prevention and control measure adaptation. Journal of Environmental Management*, 206, 863–871. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.11.076>
- Veiga, M. M.; Silva, D. M.; Veiga, L. B. E. e De Castro Faria, M. V. (2006). *Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. Cadernos de Saude Publica*, 22(11), 2391–2399. <https://doi.org/10.1590/s0102-311x2006001100013>
- Wanwimolruk, S.; Kanchanamayoon, O.; Phopin, K. e Prachayasittikul, V. (2015). *Science of the Total Environment Food safety in Thailand 2 : Pesticide residues found in Chinese kale ( Brassica oleracea ), a commonly consumed vegetable in Asian countries. Science of the Total Environment*, The, 532, 447–455. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.04.114>

WHO (2003a). *Regional per Capita Consumption Of Raw and Semi-processed Agricultural Commodities*. Food Safety Department. Geneva, Switzerland. ISBN 92 4 159108 0

WHO (2003b). *Health risks of persistent organic pollutants from long-range transboundary air pollution*. Regional Office for Europe. Scherfigsvej 8, DK-2100 Copenhagen, Denmark

Yu, Y. L.; Fang, H.; Wang, X.; Wu, X. M.; Shan, M. e Yu, J. Q. (2006). *Characterization of a fungal strain capable of degrading chlorpyrifos and its use in detoxification of the insecticide on vegetables*. *Biodegradation*, 17(5), 487–494. <https://doi.org/10.1007/s10532-005-9020-z>

Zhang, S.; Zhou, S.; Lyu, B.; Qiu, N.; Li, J.; Zhao, Y. e Wu, Y. (2021). *Dietary Exposure to Fumonisin and Health Risk Assessment in the Sixth China Total Diet Study — China, 2015–2020*. *China CDC Weekly*, 3(29), 627–632. <https://doi.org/10.46234/ccdcw2021.136>

Zhang, W.; Lin, Z.; Pang, S.; Bhatt, P. e Chen, S. (2020). *Insights Into the Biodegradation of Lindane ( $\gamma$ -Hexachlorocyclohexane) Using a Microbial System*. *Frontiers in Microbiology*, 11(March), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00522>

## ANEXOS

### A.1 Curvas de calibração usadas na validação da matriz da couve em GC-MS

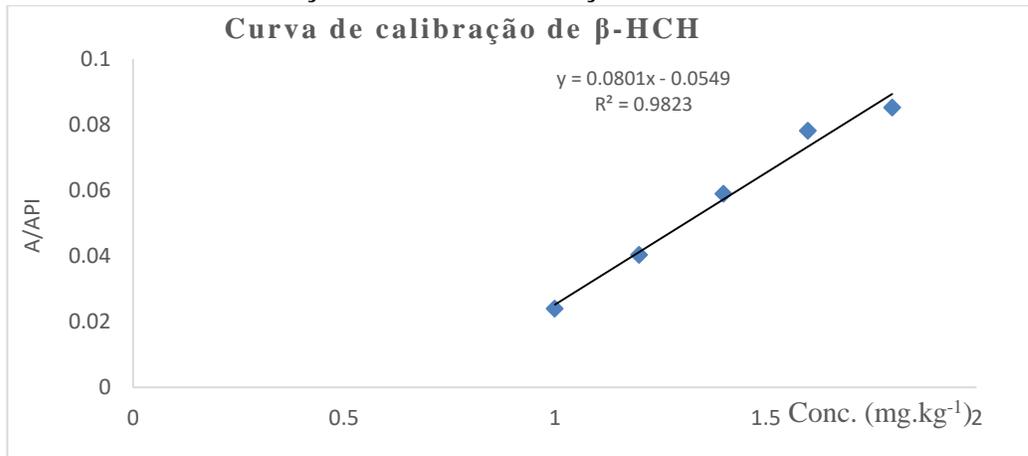


Ilustração 1A.1.1 Curva de calibração para análise de  $\beta$ -HCH

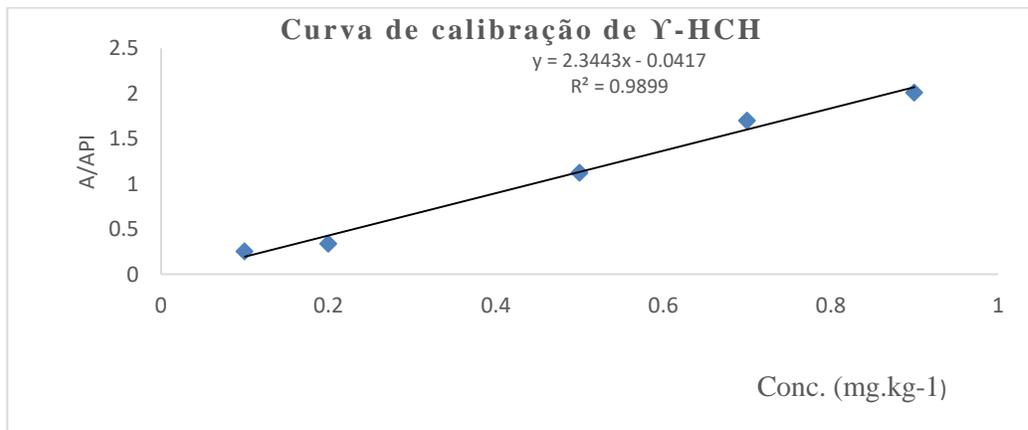


Ilustração 2 A.1.2 Curva de calibração para análise de  $\gamma$ -HCH

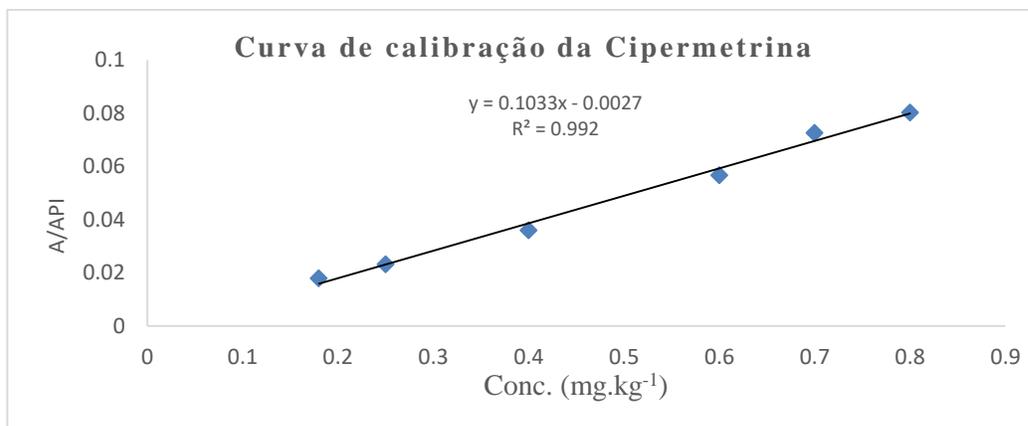


Ilustração 3 A.1.3 Curva de calibração para análise da cipermetrina

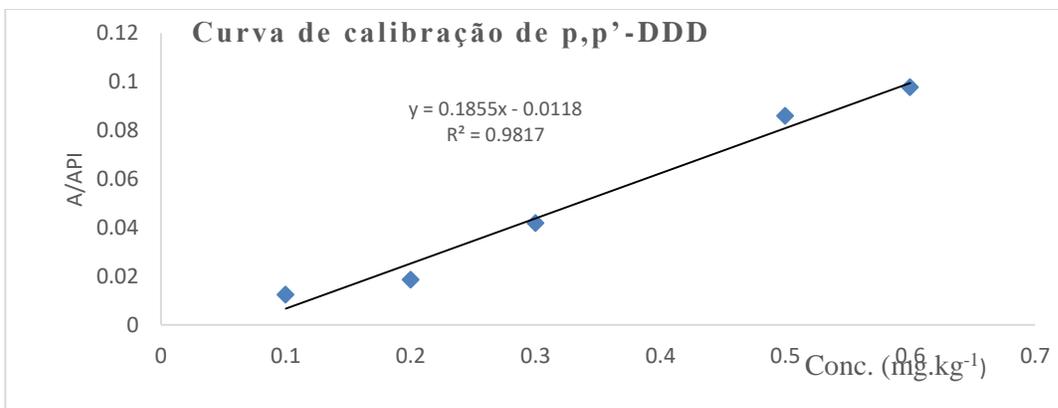


Ilustração 4 A.1.4 Curva de calibração para análise de p,p'-DDD

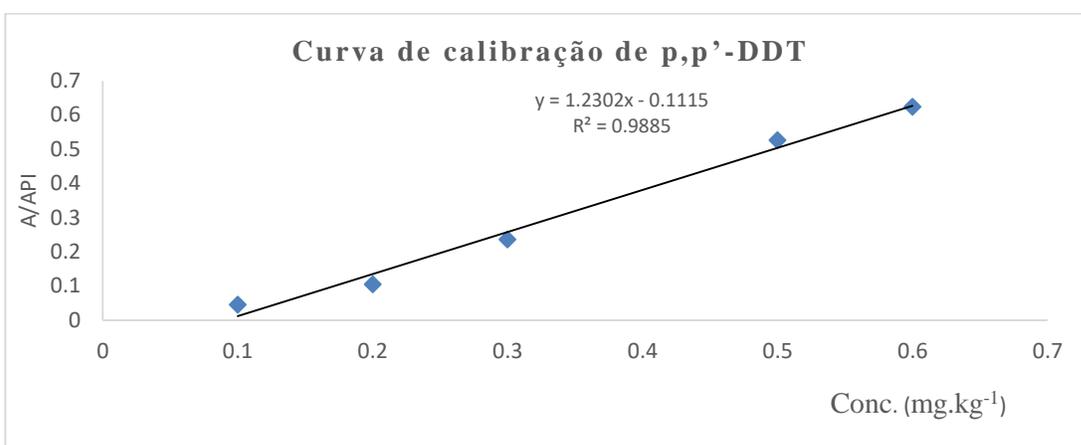


Ilustração 5A.1.5 Curva de calibração para análise de p,p'-DDT

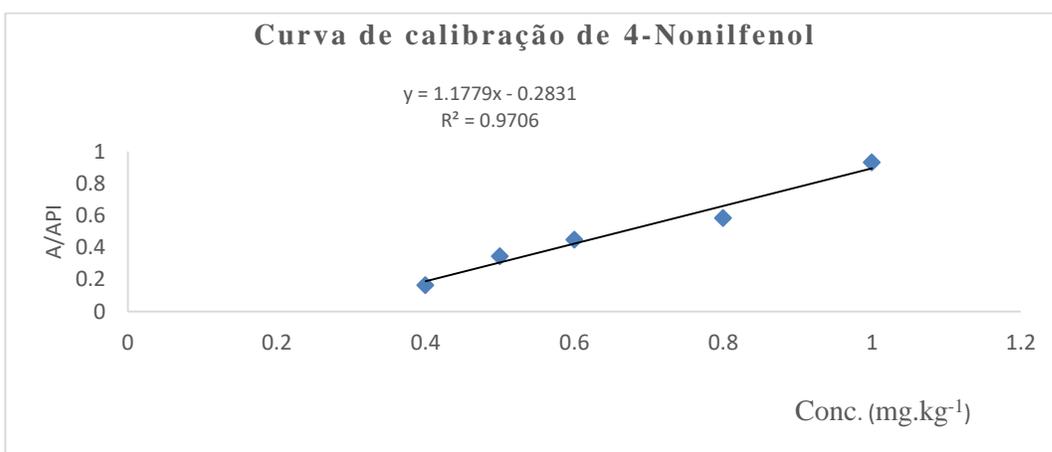


Ilustração 6 A.1.6 Curva de calibração para análise do 4-nonilfenol

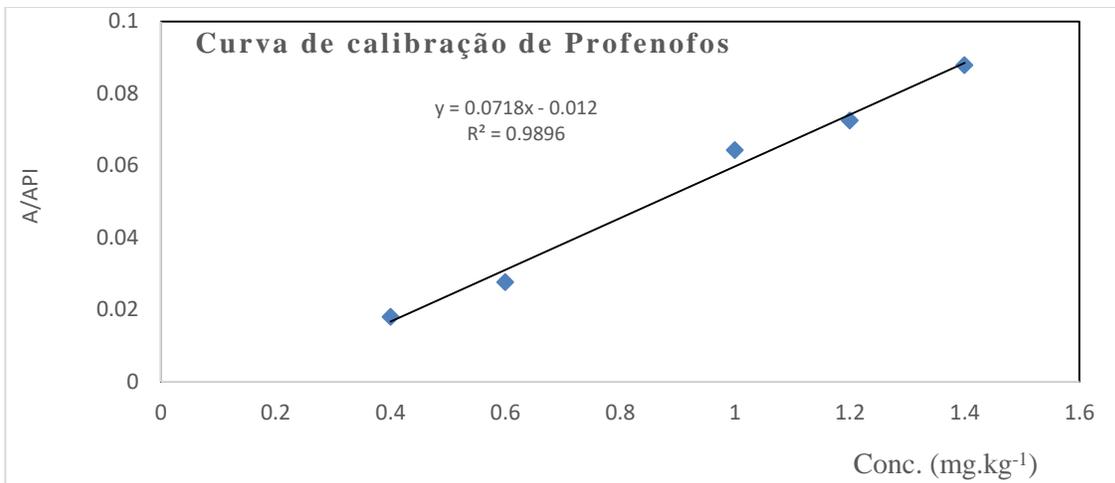


Ilustração 1 A.1.7 Curva de calibração para análise de profenofos

A.2 Curvas de calibração usadas na quantificação dos compostos em amostras por GCxGC/TOFMS

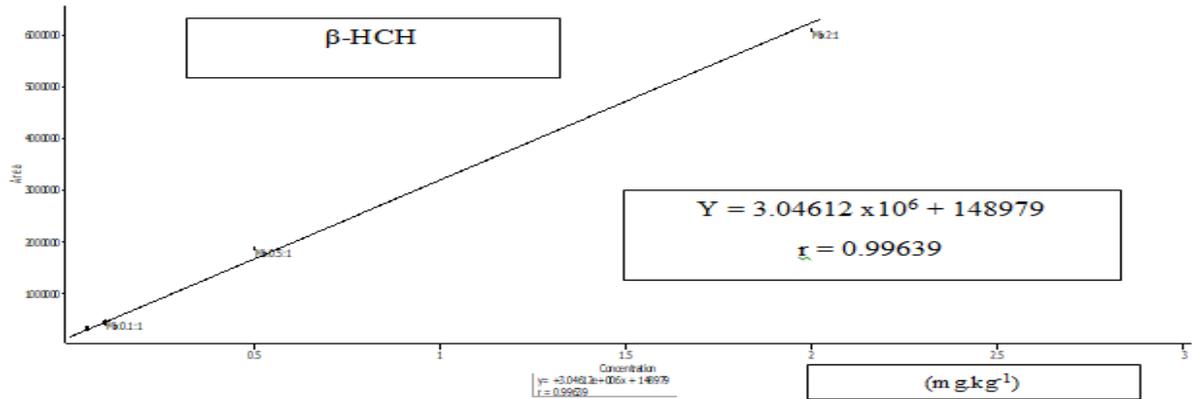


Ilustração 2. A.2.1 Curva de calibração para análise de β-HCH

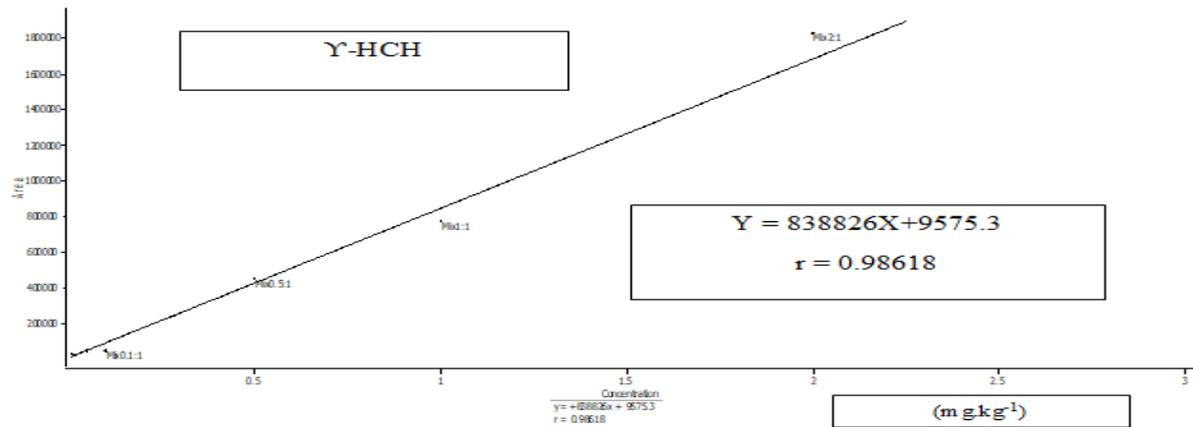


Ilustração 3. A.2.2 Curva de calibração para análise de γ-HCH

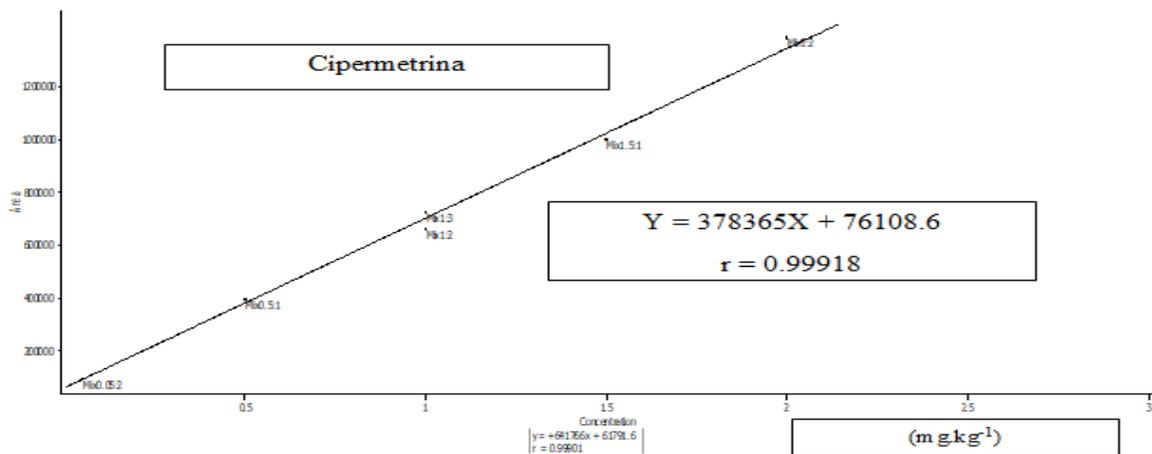


Ilustração 4. A.2.3 Curva de calibração para análise da cipermetrina

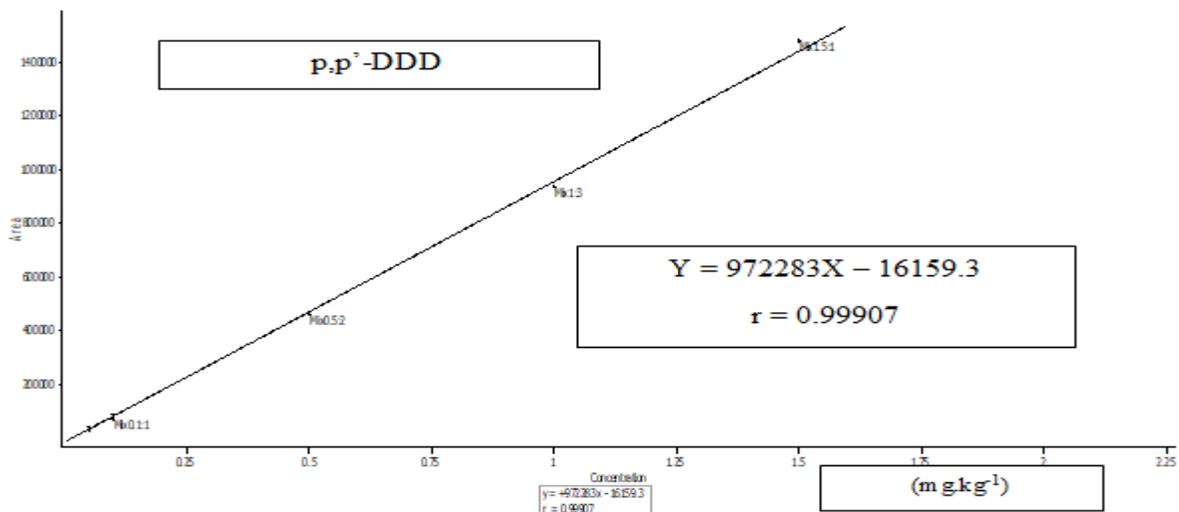


Ilustração 5. A.2.4 Curva de calibração para análise do p,p'-DDD

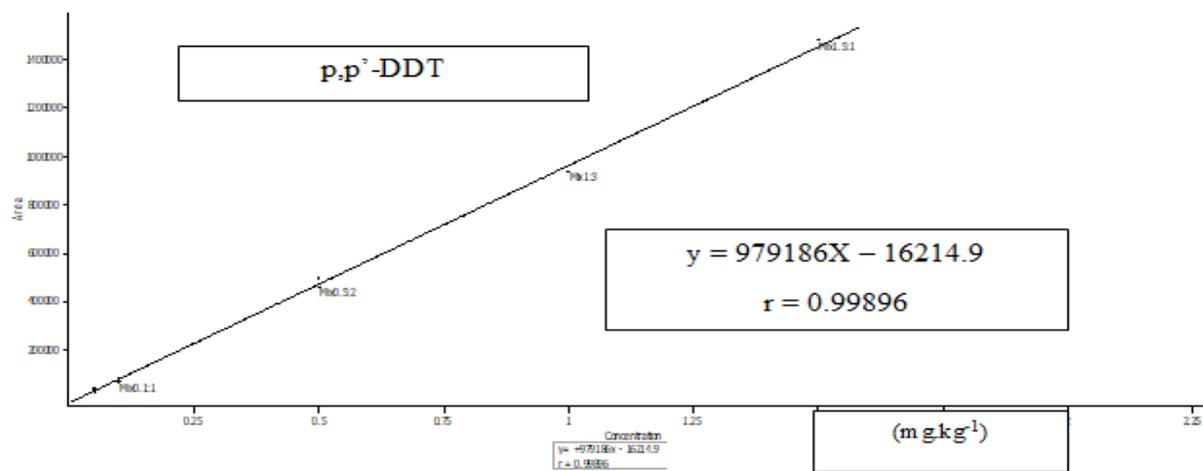


Ilustração 6. A.2.5 Curva de calibração para análise do p,p'-DDT

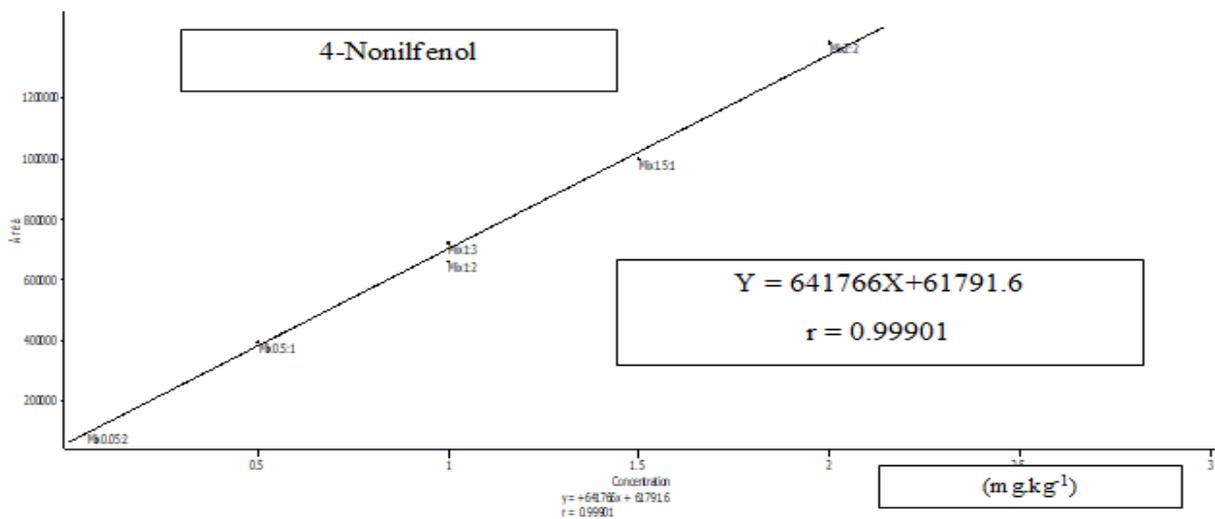


Ilustração 7. A.2.6 Curva de calibração para análise do 4-nonilfenol

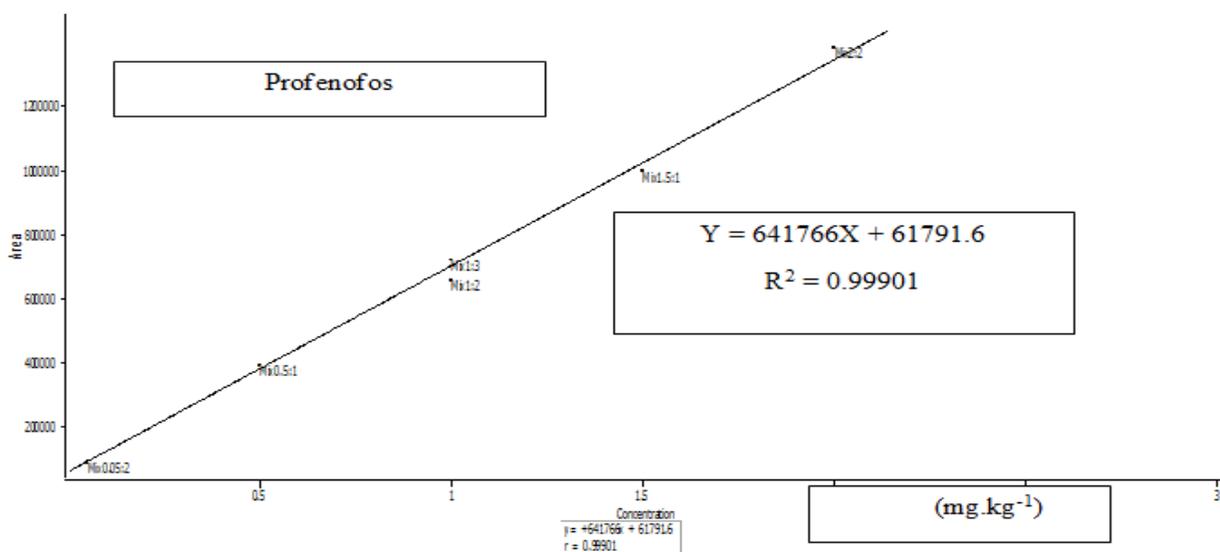


Ilustração 8. A.2.7 Curva de calibração para análise de profenofos

### A.3 Curvas de calibração usadas na validação da matriz do peixe em GC-MS

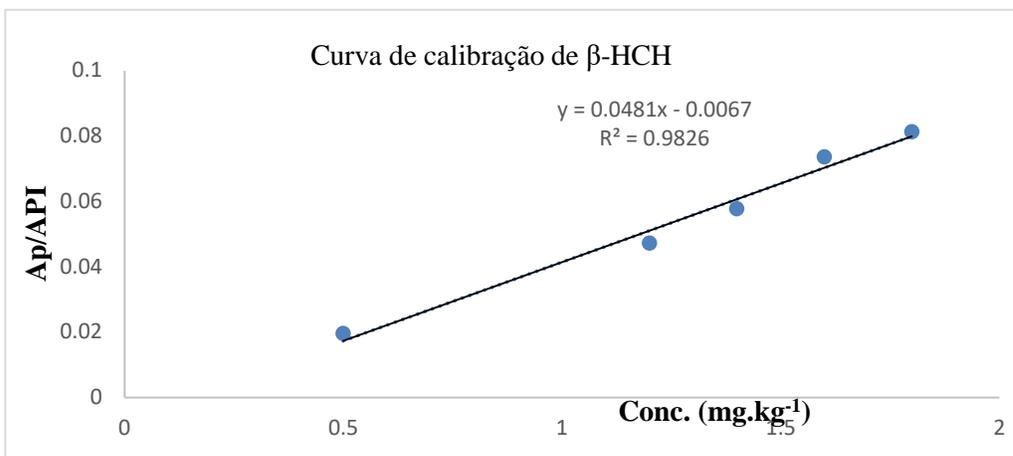


Ilustração 9. A.3.1 Curva de calibração para análise de  $\beta$ -HCH

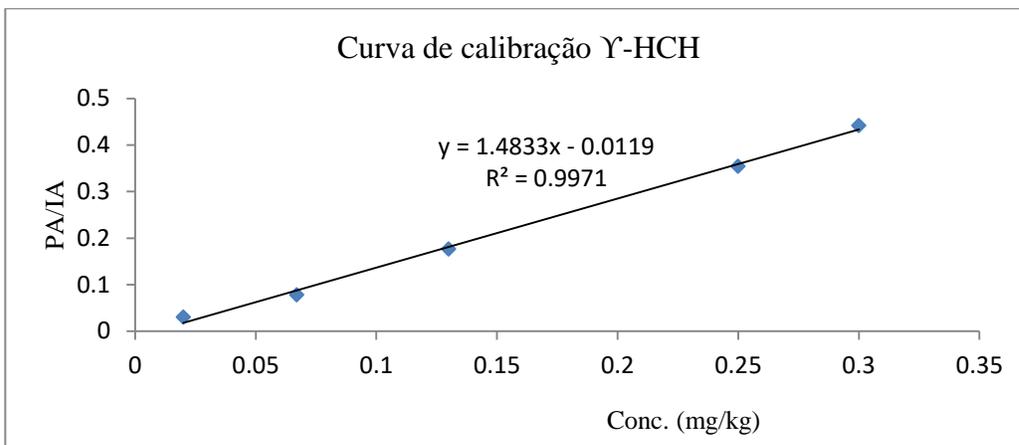


Ilustração 10. A.3.2 Curva de calibração para análise de  $\gamma$ -HCH

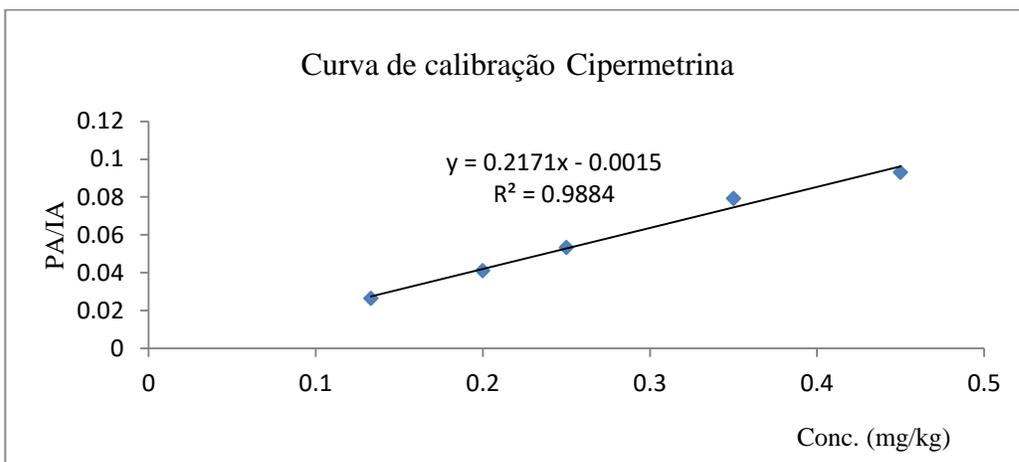


Ilustração 11. A.3.3 Curva de calibração para análise da cipermetrina

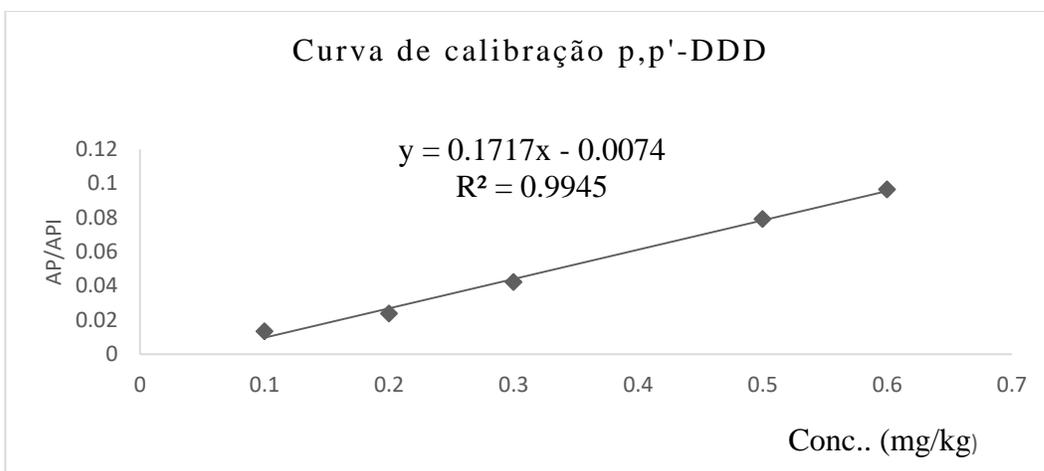


Ilustração 12. A.3.4 Curva de calibração para análise de p,p'-DDD

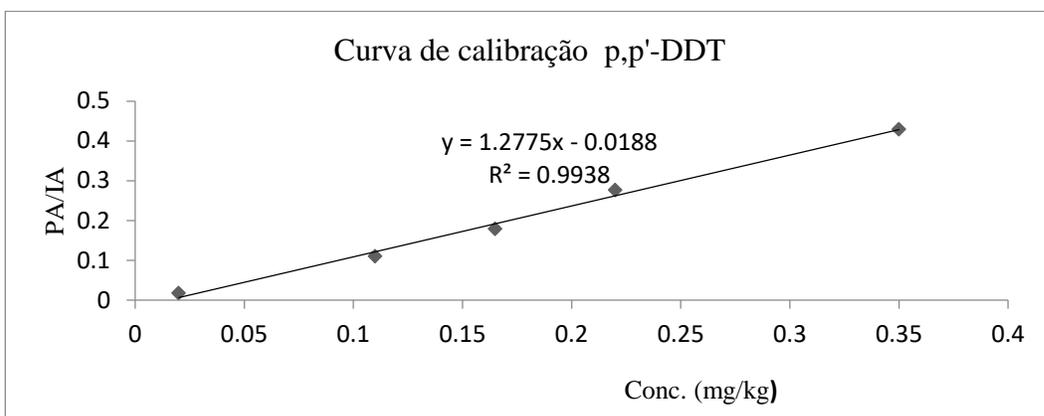


Ilustração 13. A.3.5 Curva de calibração para análise de p,p'-DDT

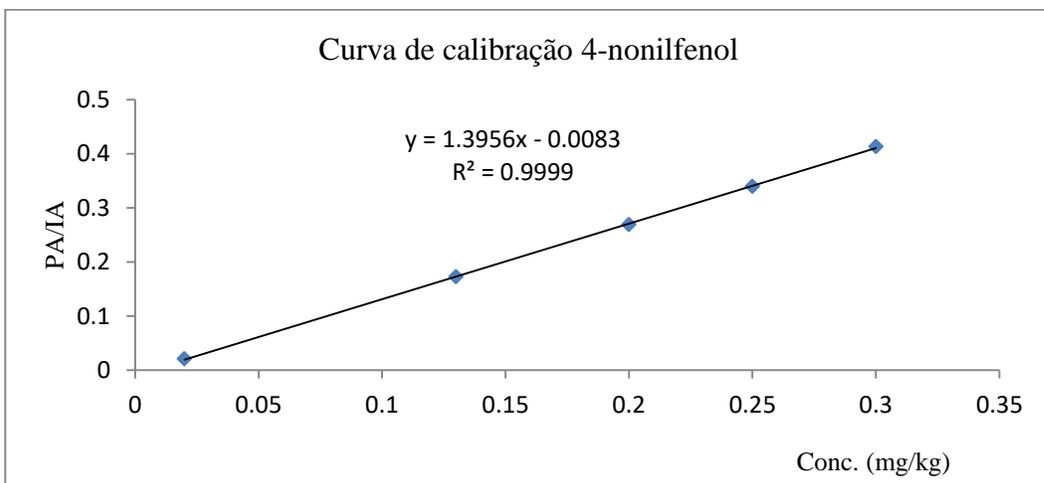


Ilustração 14. A.3.6 Curva de calibração para análise de 4-nonilfenol

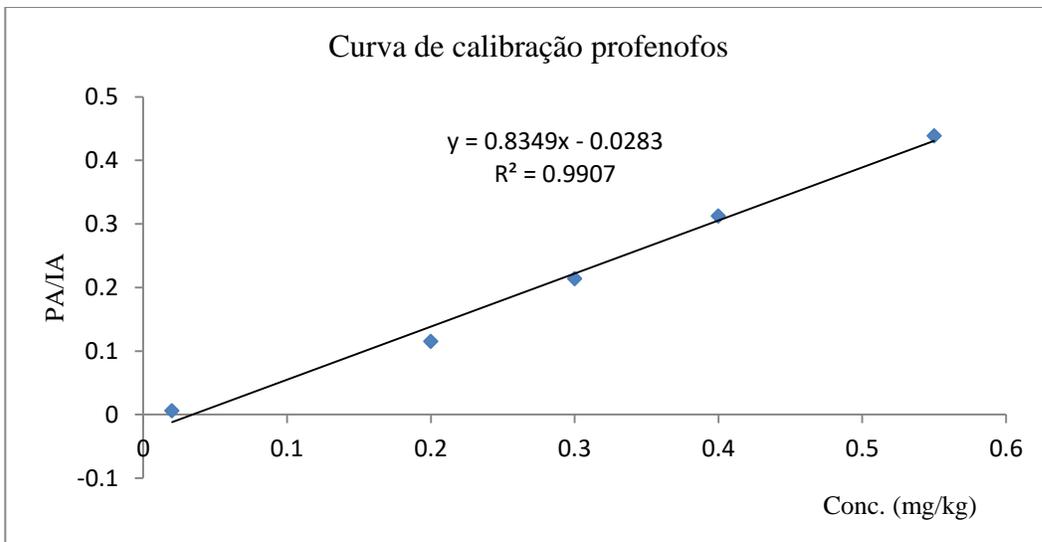


Ilustração 15. A.3.7 Curva de calibração para análise de profenofos

## B Características espectrais e estruturas químicas dos compostos estudados

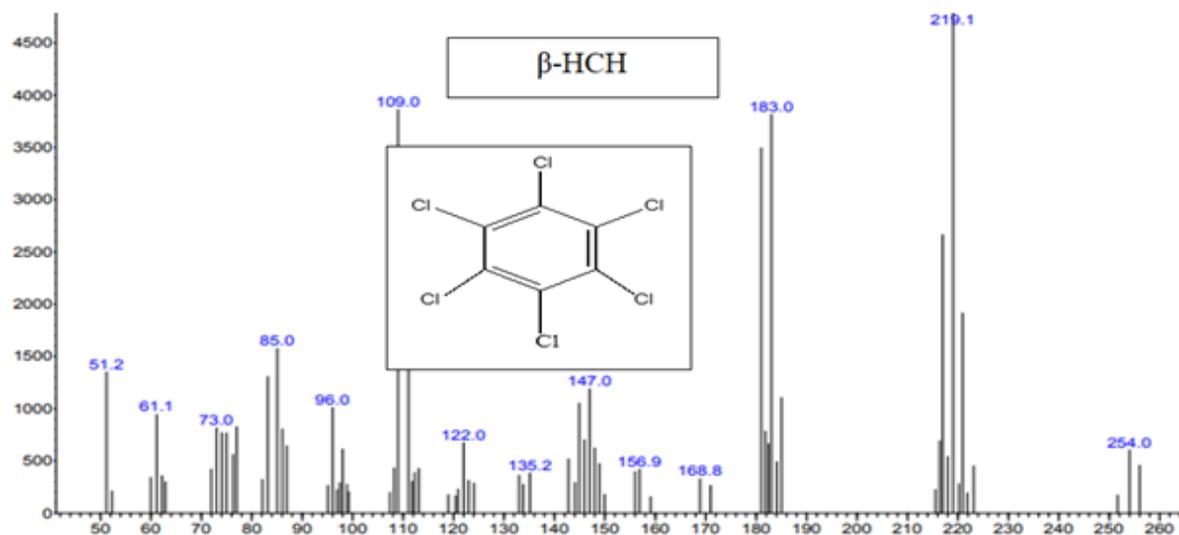


Ilustração 16. B.1 Características espectral e fórmula estrutural de  $\beta$ -HCH

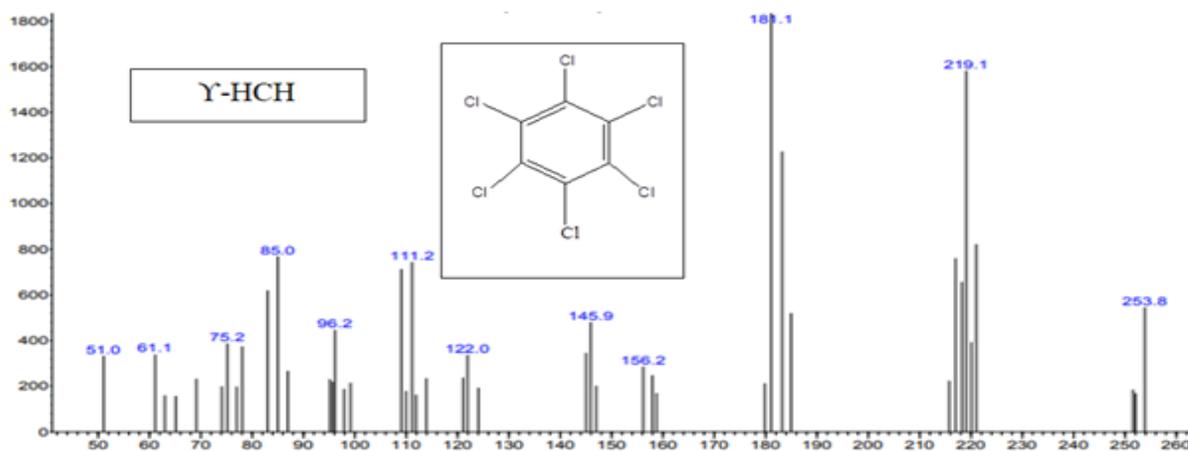


Ilustração 17. B.2 Características espectral e fórmula estrutural de  $\gamma$ -HCH

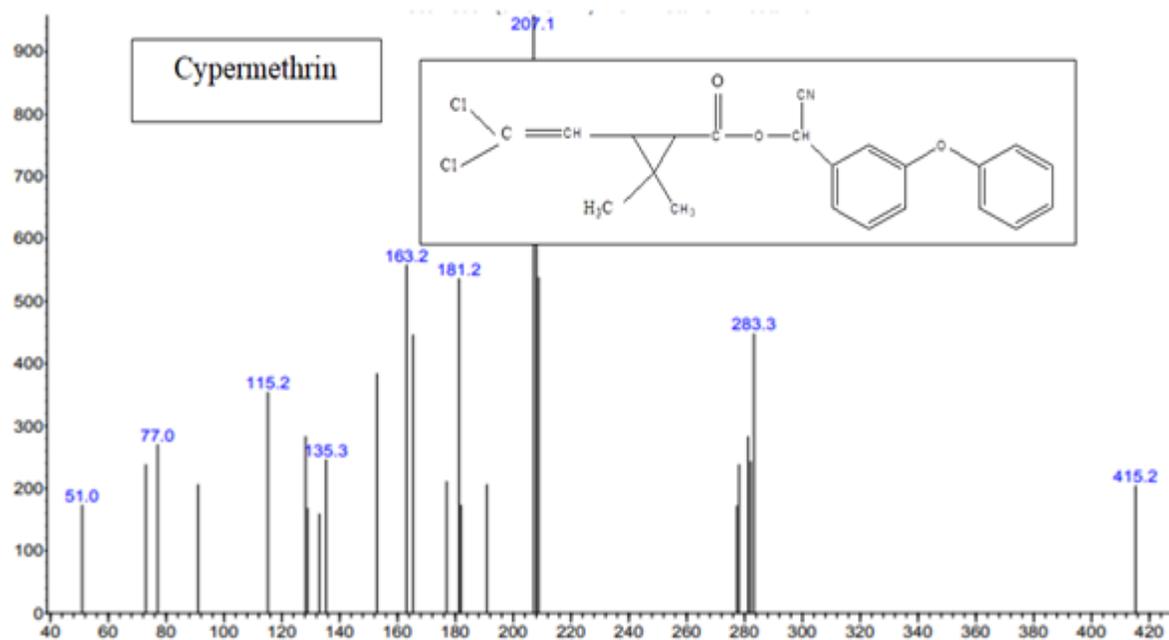


Ilustração 18. B.3 Características espectral e fórmula estrutural da cipermetrina

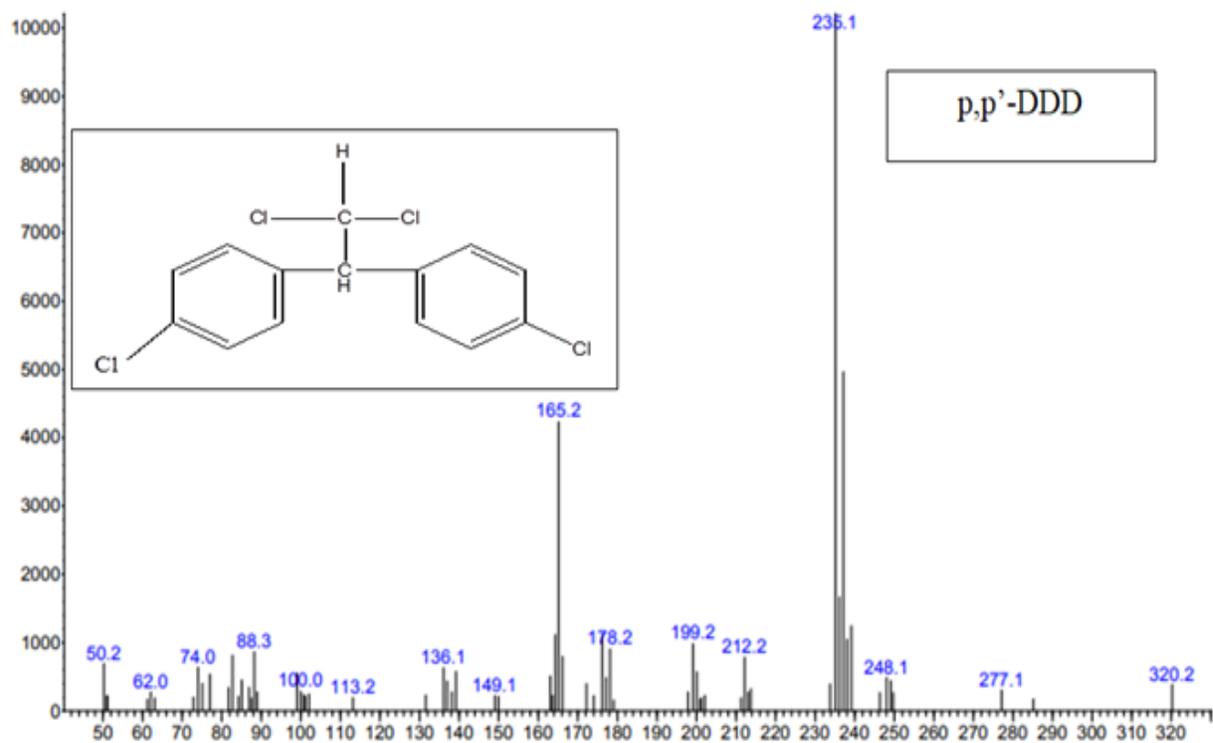


Ilustração 19. B.4 Características espectral e fórmula estrutural do p,p'-DDD

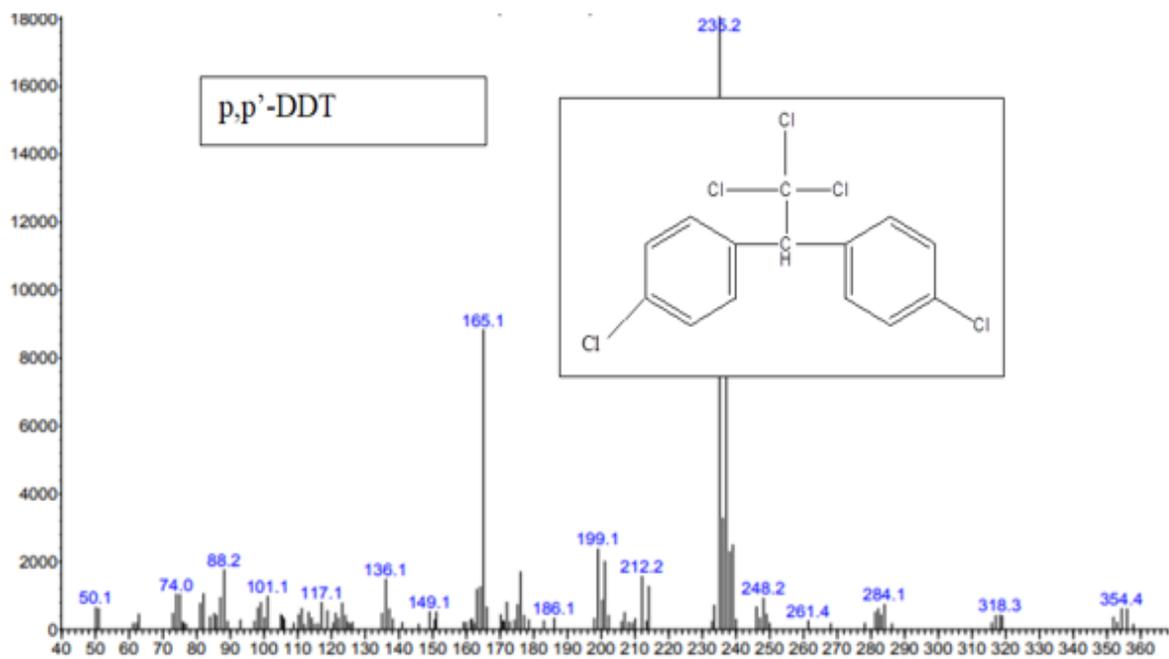


Ilustração 20. B.5 Características espectral e fórmula estrutural do p,p'-DDT

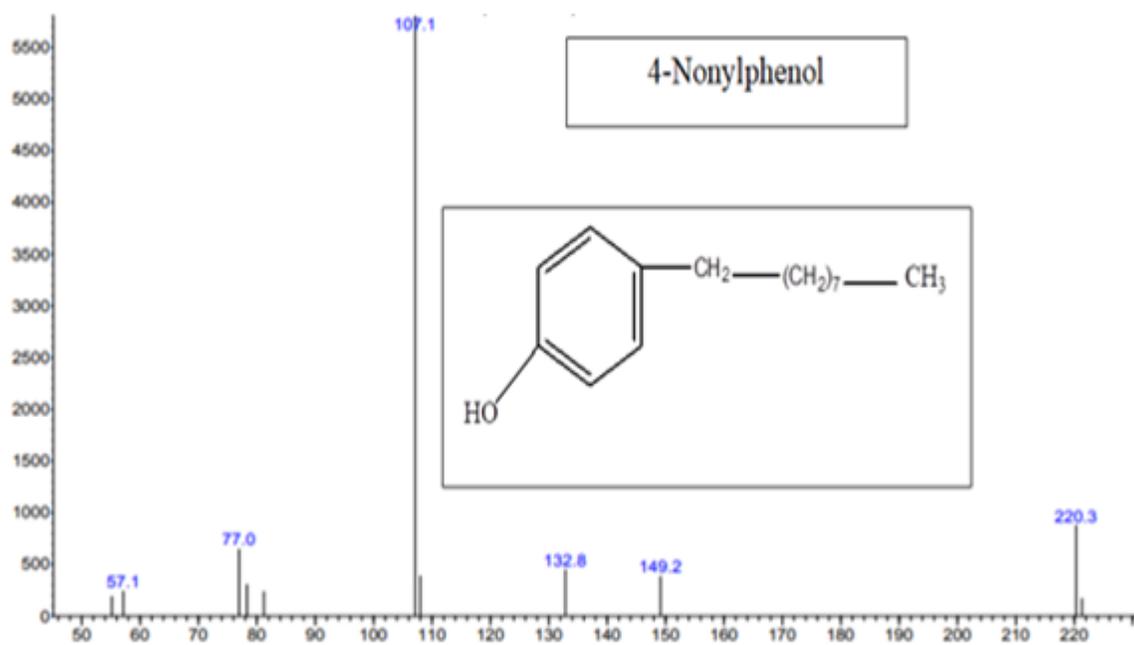


Ilustração 21. B.6 Características espectral e fórmula estrutural do 4-nonilfenol

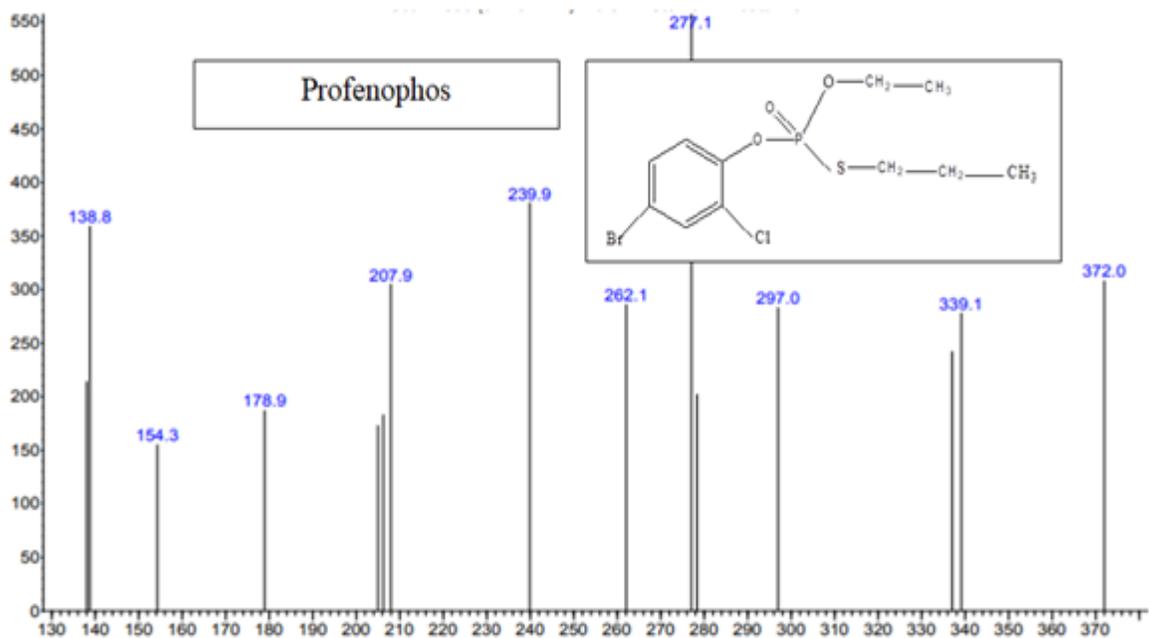


Ilustração 22. B.7 Características espectral e fórmula estrutural de profenofos

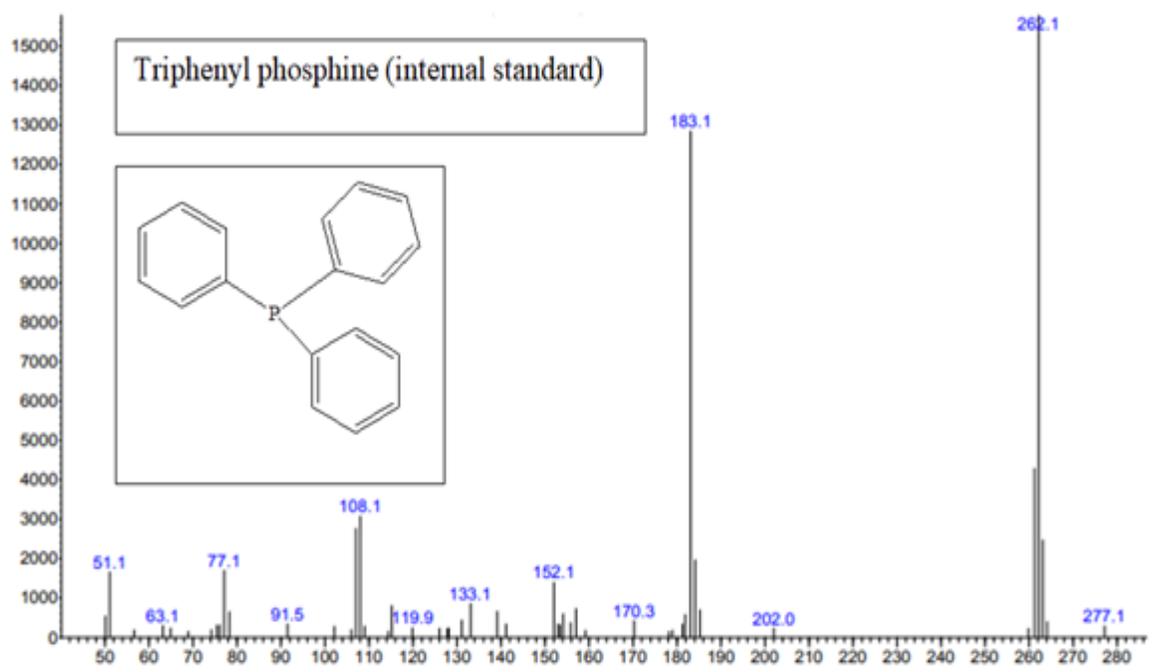


Ilustração 23. B.8 Características espectral e fórmula estrutural da trifenilfosfina

Ilustração 24. C1 Valores do índice de toxicidade dos pesticidas (PTI) e dos quocientes de perigo (HQ), para os diferentes pesticidas quantificados

Pesticida	Couve		Repolho		Peixe		Peixe		Peixe	
	Conc. média (mg kg <sup>-1</sup> )	HQ	Conc. média (mg kg <sup>-1</sup> )	HQ	Codex database [MRLs (mg kg <sup>-1</sup> )]	Conc. média (mg kg <sup>-1</sup> )	HQ	Codex database [MRLs (mg kg <sup>-1</sup> )]	Codex database [MRLs (mg kg <sup>-1</sup> )]	Codex database [MRLs (mg kg <sup>-1</sup> )]
β-HCH	ND	-	1,61	1,61	1	ND	-	0,01		
γ-HCH	0,559	0,56	ND	-	1	0,230	23	0,01		
Cipermetrin a	ND	-	0,720	-	1	ND	-	--		
p,p'-DDD	1,096	21,92	0,782	15,64	0,05	0,195	0,98	0,2		
P,P'-DDT	0,364	7,28	0,733	14,66	0,05	ND	-	0,2		
4-Nonilfenol	ND	-	ND	-	-	0,775	-	-		
Profenofos	2,07	2,07	5,59	5,59	1	ND	-	-		
-	<b>PTI [ΣHQ]</b>	<b>31,83</b>	<b>PTI [ΣHQ]</b>	<b>37,50</b>	-	<b>PTI [ΣHQ]</b>	<b>23,98</b>	-		

Ilustração 25. C2 Avaliação do risco de exposição do consumidor adulto e crianças, na ingestão da couve e repolho frescos (38.8 g/pessoa. dia)

Composto	Couve						Repolho					
	ADI (mg kg <sup>-1</sup> .bw)	Conc. média (mg kg <sup>-1</sup> )	EDI	EDI*	HI	HI*	Conc. média (mg kg <sup>-1</sup> )	EDI	EDI*	HI	HI*	
β-HCH	0,015 <sup>a</sup>	ND	-	-	-	-	1,61	1,04x10 <sup>-3</sup>	2,74x10 <sup>-3</sup>	0,069	0,183	
γ-HCH	0,003 <sup>a</sup>	0,559	3,61x10 <sup>-4</sup>	1,45x10 <sup>-3</sup>	0,120	0,483	ND	-	-	-	-	
Cipermetrina	0,02 <sup>b</sup>	ND	-	-	-	-	0,720	4,66x10 <sup>-4</sup>	1,86x10 <sup>-3</sup>	0,023	0,093	
p,p'-DDD	0,001 <sup>a</sup>	1,096	7,09x10 <sup>-4</sup>	2,83x10 <sup>-3</sup>	0,709	2,83	0,782	5,06x10 <sup>-4</sup>	2,02x10 <sup>-3</sup>	0,506	2,02	
P,P'-DDT	0,02 <sup>a</sup>	0,364	2,35x10 <sup>-4</sup>	9,42x10 <sup>-4</sup>	0,012	0,047	0,733	4,74x10 <sup>-4</sup>	1,90x10 <sup>-3</sup>	0,024	0,095	
4-Nonilfenol	-	ND	-	-	-	-	ND	-	-	-	-	
Profenofos	0,03 <sup>b</sup>	2.07	1,34x10 <sup>-3</sup>	5,34x10 <sup>-3</sup>	0,045	0,178	5,59	3,61x10 <sup>-3</sup>	0,014	0,120	0,467	

<sup>a</sup>Oyeyiola *et al.* (2017); <sup>b</sup>National Health and Family Planning Commission (2016) EDI e EDI\*-ingestão diária estimada para pessoa adulta e criança respectivamente; HI e HI\*- índice do risco à saúde para pessoa adulta e criança

Ilustração 26. C3 Avaliação do risco de exposição do consumidor adulto e crianças, na ingestão do peixe de águas frescas (6.1 g/pessoa. dia)

Composto	ADI (mg kg <sup>-1</sup> .bw)	Conc. média (mg kg <sup>-1</sup> )	Peixe			
			EDI	EDI*	HI	HI*
β-HCH	0,015 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-
γ-HCH	0,003 <sup>a</sup>	0,230	2,34x10 <sup>-5</sup>	9,35x10 <sup>-5</sup>	0,008	0,031
Cipermetrina	0,02 <sup>b</sup>	ND	-	-	-	-
p,p'-DDD	0,001 <sup>a</sup>	0,195	1,95x10 <sup>-5</sup>	7,93x10 <sup>-5</sup>	0,020	0,079
P,P'-DDT	0,02 <sup>a</sup>	ND	-	-	-	-
4-Nonilfenol	-	0,775	7,88x10 <sup>-5</sup>	3,15x10 <sup>-4</sup>	-	-
Profenofos	0,03 <sup>b</sup>	ND	-	-	-	-

<sup>a</sup>Oyeyiola *et al.* (2017); <sup>b</sup>National Health and Family Planning Commission (2016) EDI e EDI\*- ingestão diária estimada para pessoa adulta e criança respectivamente; HI e HI\*- índice do risco à saúde para pessoa adulta e criança