

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Química e Bioquímica



**Determinação de pesticidas por cromatografia gasosa com deteção por
captura eletrónica (GC-ECD) e por cromatografia líquida associada a
espectrometria de massa (LC-MS/MS)**

Romeu Ventura Martinho de Avó

Dissertação de
Mestrado em Química Tecnológica

2015

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Química e Bioquímica



**Determinação de pesticidas por cromatografia gasosa com deteção por
captura eletrónica (GC-ECD) e por cromatografia líquida associada a
espectrometria de massa (LC-MS/MS)**

Romeu Ventura Martinho de Avó

Dissertação orientada pela
Prof.^ª Doutora Ângela Filomena Simões dos Santos

Mestrado em Química Tecnológica

2015

Agradecimentos

Muitas foram as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho. A todas elas quero expressar a minha sincera gratidão.

À Eng.^a Maria João Benoniel e à Dr.^a Elisabete Ferreira pela oportunidade de realização deste estágio no Laboratório da EPAL.

Ao Dr. Vítor Cardoso pela disponibilidade, simpatia, profissionalismo e paciência, bem como, o conhecimento transmitido, sugestões e críticas feitas durante a revisão desta dissertação.

Ao Dr. Alexandre Rodrigues, responsável pela minha coordenação e supervisão na EPAL, por todo o conhecimento transmitido no funcionamento prático das diversas técnicas e programas utilizados, pela competência científica, orientação no trabalho, disponibilidade revelada durante o trabalho, assim como pelas sugestões, correções e críticas feitas durante a orientação do trabalho.

À Prof.^a Doutora Ângela Santos pelos conselhos, interesse e disponibilidade demonstrada sempre que foi necessário.

À Dr.^a Vanessa Gaffney pela orientação e sugestões feitas ao longo de todo o trabalho, bem como a grande ajuda na resolução de alguns problemas fulcrais do método de cromatografia líquida entre outros problemas mais simples, tendo-se demonstrado sempre disponível quando necessário.

À Dr.^a Ana Penetra pela orientação e sugestões feitas ao longo de todo trabalho, bem como toda a ajuda no desenvolvimento do método de cromatografia gasosa, bem como na utilização dos programas dos equipamentos envolvidos nesta parte do trabalho.

À Dr.^a Ana Neto, Sr. Ângelo Pires, Sr. António Pato, Dr.^a Cristina Correia por toda a disponibilidade e paciência que demonstraram sempre que foi necessário a sua ajuda.

À dona Júlia Robalo e Vânia Santos por manterem todo o material de laboratório sempre proto para utilizar, bem como pela disponibilidade e paciência demonstrada.

Gostaria ainda de agradecer pela amizade, boa disposição demonstrada tanto pela equipa de química orgânica como de todas as outras pessoas com quem tive mais convívio.

Por fim, mas não menos importante, gostaria de agradecer à minha mãe e irmão por todo o apoio e suporte dado, bem como à dona Mariana Saramago e João Saramago, que me acolheram como membro da família ao longo desta jornada, e sem a ajuda dos quais não teria sido possível realizar esta dissertação.

Resumo

Este trabalho enquadra-se na necessidade de desenvolver métodos analíticos por parte da EPAL para o controlo de substâncias prioritários segundo a Diretiva Europeia do Quadro da Água, bem como satisfazer pedidos de entidades privadas para o controlo de alguns pesticidas.

Neste contexto o objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de técnicas analíticas para a monitorização de 14 pesticidas em água superficial, subterrânea e para consumo humano.

A técnica analítica utilizada foi a cromatografia líquida de ultra eficiência associada à espectrometria de massa (UPLC-MS/MS), com ionização por *electrospray*, tendo-se recorrido à técnica de cromatografia gasosa com deteção por captura eletrónica (GC-ECD) para desenvolver o método para os pesticidas que não foi possível validar pela técnica de UPLC-MS/MS.

No final validaram-se métodos analíticos para a monitorização de 10 dos 14 pesticidas. O método de UPLC-MS/MS foi validado para 6 pesticidas, por injeção direta, com um passo de diluição da amostra, e o método de GC-ECD foi validado para 4 pesticidas com um passo de extração dos analitos por extração em fase sólida (SPE).

Palavras-chave: Água, UPLC-MS/MS, Análise de pesticidas, GC-ECD, SPE.

Abstract

The scope of this work was to develop and validate analytical methods for the analysis of 14 emergent pesticide residues in groundwater and water intended for human consumption, in an effort from EPAL (Empresa Portuguesa de Águas, Livres, S.A.) to continue to comply with the latest European and Portuguese legislations in water monitoring, as well as to fulfill customer requests.

For this purpose, ultra-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry detection (UPLC-MS/MS), and gas chromatography with electron capture detection (GC-ECD), were used to optimize and validate two different methods for analysis of pesticides in water.

From the initial 14 pesticide residues, was possible to successfully validate a UPLC-MS/MS method for 6 pesticide residues and a GC-ECD method for 4 pesticide residues.

The UPLC-MS/MS method presented here consists of a direct injection method, using electrospray (ESI) as ionization mode and operating in multi-reaction monitoring mode (MRM). The GC-ECD method relied on solid phase extraction (SPE) as sample preparation method and using a micro-electron capture detector (μ ECD).

Keywords: water analysis, pesticide residue monitoring, ultra-performance liquid chromatography, UPLC-MS/MS, tandem mass spectrometry, direct injection, GC-ECD, solid phase extraction.

Índice Geral

AGRADECIMENTOS	I
RESUMO	III
ABSTRACT	IV
ÍNDICE GERAL	V
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
ÍNDICE DE TABELAS	XIV
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	XVI
1 ÁGUA	1
2 EPAL	2
3 PESTICIDAS	4
3.1 LEGISLAÇÃO	5
3.2 CLASSIFICAÇÃO	8
3.2.1 <i>Classificação consoante o tipo de organismo alvo</i>	8
3.2.1.1 Acaricidas	9
3.2.1.2 Fungicidas	10
3.2.1.3 Herbicidas	10
3.2.1.4 Inseticidas	11
3.2.1.5 Moluscicidas	12
3.2.1.6 Nematocidas.....	12
3.2.1.7 Ovicidas	13
3.2.2 <i>Classificação com base na origem química</i>	13
3.2.2.1 Metabolitos	15
3.2.3 <i>Classificação com base no risco potencial para a saúde humana</i>	15
3.3 UTILIZAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA	16
3.4 VANTAGENS E DESVANTAGENS	16
3.5 PESTICIDAS QUE FORAM ALVO DO ESTUDO	18
4 MÉTODO CROMATOGRÁFICO	20
4.1 GERAL.....	20
4.1.1 <i>Colunas</i>	23
4.1.1.1 Colunas cromatográficas fechadas com enchimento.....	23
4.1.1.2 Colunas cromatográficas tubulares abertas	24

4.2	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA (LC)	25
4.2.1	<i>Funcionamento geral</i>	25
4.2.2	<i>Bomba</i>	26
4.2.3	<i>Injeção</i>	26
4.3	CROMATOGRAFIA GASOSA (GC)	26
4.3.1	<i>Funcionamento geral</i>	26
4.3.2	<i>Injetor</i>	28
4.3.3	<i>Forno</i>	29
4.4	EFEITO DE MATRIZ	30
5	DETETORES	31
5.1	ESPECTROMETRIA DE MASSA (MS)	31
5.1.1	<i>Ionização</i>	32
5.1.2	<i>Analisador de massas</i>	32
5.1.3	<i>Triplo Quadrupolo (QqQ)</i>	33
5.2	DETEÇÃO POR CAPTURA ELETRÓNICA (ECD)	36
6	VALIDAÇÃO	37
6.1	INTRODUÇÃO	37
6.2	SELETIVIDADE E ESPECIFICIDADE	38
6.2.1	<i>Confirmação de positivos</i>	39
6.3	QUANTIFICAÇÃO	39
6.3.1	<i>Curva de calibração</i>	40
6.3.1.1	Gama de trabalho	41
6.3.1.2	Gama de linearidade	41
6.3.2	<i>Limiares analíticos</i>	41
6.3.2.1	Limite de Detecção (LOD)	41
6.3.2.2	Limite de Quantificação (LOQ)	42
6.4	SENSIBILIDADE	43
6.5	PRECISÃO	43
6.5.1	<i>Repetibilidade</i>	44
6.5.2	<i>Reprodutibilidade</i>	44
6.5.3	<i>Precisão intermédia</i>	45
6.5.4	<i>Robustez</i>	45
6.6	EXATIDÃO	45
6.6.1	<i>Ensaio interlaboratoriais</i>	46
6.6.2	<i>Ensaio de recuperação</i>	46
6.7	INCERTEZA GLOBAL DO MÉTODO	47

7	TÉCNICA DE PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS	48
7.1	MÉTODO DE INJEÇÃO DIRETA	48
7.2	TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE AMOSTRAS	48
7.2.1	<i>Extração Líquido-Líquido (LLE)</i>	49
7.2.1.1	Funcionamento.....	50
7.2.2	<i>Extração em Fase Sólida (SPE)</i>	51
7.2.2.1	Princípios gerais.....	51
7.2.2.2	Cartuchos de SPE e o seu enchimento	51
7.2.2.3	Efeito de matriz e Breakthrough	53
7.2.2.4	Etapas do processo de SPE	53
7.2.3	<i>Concentração e troca de solvente</i>	55
7.3	VANTAGENS E DESVANTAGENS DAS VÁRIAS TÉCNICAS DE PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS.....	56
8	MÉTODO EXPERIMENTAL	57
8.1	EQUIPAMENTO	57
8.1.1	<i>Materiais</i>	58
8.2	REAGENTES GERAIS	59
8.3	PADRÕES COMERCIAIS DE PESTICIDAS	60
8.4	AMOSTRAS	61
8.5	PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES	62
8.5.1	<i>Solventes e fase móvel para UPLC-MS/MS</i>	62
8.5.2	<i>Soluções padrão</i>	63
8.5.2.1	Soluções padrão primárias	63
8.5.2.2	Soluções padrão para o método de UPLC-MS/MS.....	64
8.5.2.2.1	Solução padrão conjunta	64
8.5.2.2.2	Solução padrão intermédia I.....	65
8.5.2.2.3	Solução padrão Intermédia II	65
8.5.2.2.4	Soluções padrão de calibração.....	65
8.5.2.2.5	Soluções padrão de controlo.....	66
8.5.2.2.6	Fortificação de amostras.....	66
8.5.2.3	Soluções padrão para o método de GC-ECD	67
8.5.2.3.1	Solução padrão conjunta	67
8.5.2.3.2	Solução padrão intermédia	67
8.5.2.3.3	Soluções padrão de calibração.....	68
8.5.2.3.4	Solução padrão de fortificação	69
8.5.2.3.5	Solução padrão de controlo	70
8.5.2.3.6	Fortificação de amostras.....	70

8.6	CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	71
8.6.1	<i>UPLC-MS/MS</i>	71
8.6.1.1	Condições de injeção, amostrador e forno da coluna cromatográfica	71
8.6.1.2	Condições da bomba	71
8.6.1.3	Condições do espectrómetro de massas	72
8.6.1.3.1	Condições de aquisição de dados	72
8.6.1.3.2	Condições de operação da fonte e detetor	73
8.6.2	<i>GC-ECD</i>	74
8.6.2.1	Coluna Phenomenex Zebron ZB-Multiresidue-2	74
8.6.2.1.1	Condições da coluna e gás de arraste	74
8.6.2.1.2	Condições de funcionamento do injetor	75
8.6.2.1.3	Condições de funcionamento do forno	75
8.6.2.1.4	Condições de funcionamento do detetor	76
8.6.2.2	Coluna Agilent Technologies HP-5MS.....	76
8.6.2.2.1	Condições da coluna e gás de arraste	76
8.6.2.2.2	Condições de funcionamento do injetor	77
8.6.2.2.3	Condições de funcionamento do forno	77
8.6.2.2.4	Condições de funcionamento do detetor	78
8.7	PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS.....	78
8.7.1	<i>UPLC-MS/MS</i>	78
8.7.1.1	Injeção direta simples.....	78
8.7.1.2	Injeção direta com diluição em solvente	79
8.7.1.3	Filtros	79
8.7.2	<i>GC-ECD</i>	79
8.7.2.1	Extração em fase sólida (SPE)	79
8.7.2.2	Extração líquido-líquido (LLE).....	81
8.7.2.3	Concentração e troca de solvente	81
9	TRATAMENTO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS.....	82
9.1	<i>UPLC-ESI-MS/MS</i>	83
9.1.1	<i>Otimização das condições de MRM</i>	83
9.1.1.1	Otimização pela técnica de Infusão direta no equipamento de MS/MS	83
9.1.1.1.1	Otimização da tensão do capilar.....	83
9.1.1.1.2	Otimização da voltagem de cone.....	85
9.1.1.1.3	Otimização da energia de colisão	87
9.1.1.2	Otimização por injeção no UPLC-MS/MS	89
9.1.1.3	Resumo dos parâmetros otimizados de MRM	89
9.1.2	<i>Gradiente da fase móvel</i>	91
9.1.3	<i>Validação da curva de calibração</i>	93
9.1.3.1	Testes de linearidade iniciais e estabilidade.....	93

9.1.3.2	Testes de Mandel, Rikilt, Áreas normalizadas e Homogeneidade de variâncias.	97
9.1.3.3	Precisão	98
9.1.3.4	Limiars analíticos	99
9.1.4	<i>Ensaio de recuperação</i>	100
9.1.4.1	Método de preparação da amostra.....	100
9.1.4.2	Estudo da eficiência do processo de filtração da amostra	101
9.1.4.3	Validação do método de preparação de amostra	103
9.1.5	<i>Limite de quantificação do método</i>	104
9.1.6	<i>Incerteza do método</i>	105
9.1.7	<i>Ensaio interlaboratoriais (EIL) e Material de referência certificado (MRC)</i> ...	106
9.2	GC-ECD	107
9.2.1	<i>Escolha do solvente em GC</i>	107
9.2.2	<i>Otimização do método de GC-ECD</i>	107
9.2.3	<i>Validação da curva de calibração</i>	109
9.2.3.1	Testes de linearidade iniciais	109
9.2.3.2	Testes de Mandel, Rikilt, Áreas normalizadas e Homogeneidade de variâncias	111
9.2.3.3	Precisão	112
9.2.3.4	Limiars analíticos	112
9.2.4	<i>Ensaio de Recuperação</i>	113
9.2.4.1	Escolha do cartucho de extração em fase sólida para o método de SPE.	113
9.2.4.2	Estudo dos interferentes	115
9.2.4.2.1	Método de extração líquido-líquido	117
9.2.4.2.2	Comparação dos métodos de SPE e LLE	118
9.2.4.2.3	Processo de limpeza para o extrato de SPE.....	119
9.2.4.3	Ensaio de recuperação.....	121
9.2.5	<i>Limite de quantificação do método</i>	122
9.2.6	<i>Incerteza do método</i>	124
10	CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	125
10.1	UPLC-MS/MS	125
10.2	GC-ECD	127
12	BIBLIOGRAFIA	130
ANEXO I	LEGISLAÇÃO	134
ANEXO II	INFORMAÇÃO GERAL DE CADA PESTICIDA, SOLVENTE E REAGENTES	136
ANEXO III	ESPECTROS DE MASSA DOS IÕES SELECIONADOS PARA O MODO DE MRM	157

ANEXO IV	DESVIO PADRÃO E COEFICIENTE DE VARIAÇÃO	163
ANEXO V	MÉTODO DOS MÍNIMOS QUADRADOS.....	171
ANEXO V.1	REGRESSÃO LINEAR	171
ANEXO V.2	COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO LINEAR	172
ANEXO VI	TESTE DA ANÁLISE DE RESÍDUOS.....	174
ANEXO VII	ESTABILIDADE DA RAZÃO DE CONFIRMAÇÃO.....	180
ANEXO VIII	TESTE DE MANDEL	186
ANEXO IX	TESTE DE RIKILT	189
ANEXO X	TESTE DAS ÁREAS NORMALIZADAS	192
ANEXO XI	HOMOGENEIDADE DE VARIÂNCIAS.....	196
ANEXO XII	LIMIARES ANALÍTICOS.....	198
ANEXO XIII	INCERTEZA GLOBAL DO MÉTODO ANALÍTICO.....	200
ANEXO XIII.1	INCERTEZA DOS PADRÕES DE CALIBRAÇÃO	200
Anexo XIII.1.1	<i>Incerteza padrão associada à pesagem do padrão comercial</i>	<i>200</i>
Anexo XIII.1.2	<i>Incerteza padrão associada ao volume utilizado para a preparação da solução padrão primária.....</i>	<i>201</i>
Anexo XIII.1.3	<i>Incerteza padrão associada à preparação das soluções intermédias e de calibração</i>	<i>203</i>
ANEXO XIII.2	INCERTEZA ASSOCIADA À INTERPOLAÇÃO NA CURVA DE CALIBRAÇÃO	204
ANEXO XIII.3	PRECISÃO INTERMÉDIA DO MÉTODO.	205
ANEXO XIII.4	INCERTEZA GLOBAL DO MÉTODO	205
ANEXO XIV	SEGURANÇA E AMBIENTE	206
ANEXO XV	ANÁLISE DE CUSTOS.....	208

Índice de figuras

Figura 4.1: Esquema geral de um equipamento de cromatografia	20
Figura 4.2: Esquema de uma coluna cromatográfica fechada usadas em cromatografia líquida	23
Figura 4.3: Coluna cromatográfica aberta para cromatografia gasosa	24
Figura 4.4: Esquema de um sistema de cromatografia líquida.....	25
Figura 4.5: Esquema de um sistema de cromatografia gasosa	27
Figura 4.6: Curvas de van Deemter para cromatografia gasosa	27
Figura 4.7: Esquema do injetor de cromatografia gasosa.....	28
Figura 5.1: Esquema de um espectrómetro de massa de triplo quadrupolo usado em cromatografia líquida.....	31
Figura 5.2: Ilustração da formação de um cone de Taylor	32
Figura 5.3: Esquema de um quadrupolo	33
Figura 5.4: Esquema de um triplo quadrupolo	34
Figura 5.5: Esquema Waters T-wave™	34
Figura 5.6: Esquema de um detetor de captura eletrónica.....	36
Figura 7.1: Ilustração de duas extrações líquido-líquido executadas sobre a mesma amostra sucessivamente.....	51
Figura 7.2: Esquema de um cartucho de extração em fase sólida	51
Figura 7.3: Exemplo de possíveis grupos substituintes da sílica.....	52
Figura 7.4: Esquema de uma extração em fase sólida.....	54
Figura 8.1: Condições de injeção, amostrador e temperatura da coluna cromatográfica	71
Figura 8.2: Condições de fluxo e gradiente da bomba	71
Figura 8.3: Janela de programação de aquisição de dados para o grupo final de pesticidas de UPLC-MS/MS	72
Figura 8.4: Janela de programação das condições de MRM	73
Figura 8.5: Condições de operação do espectrómetro de massas.....	73
Figura 8.6: Propriedades da coluna cromatográfica e condições do gás de arraste.....	74
Figura 8.7: Condições do funcionamento do injeção e modo de injeção	75
Figura 8.8: Condições de funcionamento do forno e rampa de temperaturas	75
Figura 8.9: Condições de funcionamento do detetor, temperatura e gás auxiliar	76
Figura 8.10: Propriedades da coluna cromatográfica e condições do gás de arraste.....	76
Figura 8.11: Condições do modo de injeção	77

Figura 8.12: Condições de funcionamento do forno e rampa de temperaturas	77
Figura 8.13: Condições de funcionamento do detetor, temperatura e gás auxiliar	78
Figura 8.14: Condições de operação do equipamento de SPE	80
Figura 8.15: Filtro de limpeza do extrato de SPE	80
Figura 9.1: Representação gráfica da intensidade de sinal de resposta em função da tensão do capilar para o ião precursor de cada pesticida	85
Figura 9.2: Representação gráfica da intensidade de sinal de resposta em função da variação de tensão de cone para o ião precursor de cada pesticida	86
Figura 9.3: Representação gráfica da intensidade de sinal de resposta com a variação da energia de colisão para os iões precursor e produto selecionados para as transições MRM1 e MRM2.....	88
Figura 9.4: Cromatograma individual típico para a transição de quantificação (MRM1) dos vários pesticidas	92
Figura 9.5: Representação da curva de calibração e da razão de confirmação para o pesticida etoprofos	94
Figura 9.6: Representação do resultado da análise de resíduos para o pesticida etoprofos	94
Figura 9.7: Representação do resultado dos testes de Rikilt e áreas normalizadas para o pesticida etoprofos.....	98
Figura 9.8: Comparação da recuperação obtida para os vários pesticidas pelos 2 métodos de preparação de amostra	101
Figura 9.9: Estudo da eficiência do processo de filtração.	102
Figura 9.10: Recuperação média da fortificação para as várias matrizes e global do método analítico	103
Figura 9.11: Apresentação do resultado da participação no ensaio interlaboratorial ...	106
Figura 9.12: Comparação da área obtida para os vários solventes.....	107
Figura 9.13: Cromatograma das condições otimizadas para a coluna cromatográfica: HP-5MS, B) Zebron.....	108
Figura 9.14: Exemplo de uma curva de calibração validada, teste da análise de resíduos	110
Figura 9.15: Representação do resultado dos testes de Rikilt e áreas normalizadas para o pesticida aclonifena.	111
Figura 9.16: Recuperação média para os cartuchos de SPE avaliados em água ultrapura.	114

Figura 9.17: Recuperação média para os cartuchos de SPE Isolute C18 (EC) de 1 g e Oasis HLB de 200 mg em água para consumo humano.....	114
Figura 9.18: Cromatogramas de amostras extraídas por SPE	116
Figura 9.19: Cromatogramas do método de LLE para a matriz: água para consumo humano	117
Figura 9.20: Recuperação média do método de LLE para a matriz: água para consumo humano	118
Figura 9.21: Comparação entre as recuperações obtidas para o ensaio teste de LLE e de SPE com o cartucho Isolute C18 (EC), 1 g	118
Figura 9.22: Comparação da recuperação com e sem filtração do extrato de SPE em amostras de água para consumo humano	119
Figura 9.23: Cromatogramas do extrato de SPE filtrado.....	120
Figura 9.24: Recuperação média de cada pesticida em cada uma das matrizes avaliadas	121
Figura III.1:Espectros de massa do pesticida ometoato	157
Figura III.2:Espectros de massa do pesticida metomil	158
Figura III.3:Espectros de massa do pesticida diclorvos	159
Figura III.4:Espectros de massa do pesticida terbutrina.....	160
Figura III.5:Espectros de massa do pesticida azoxistrobina.....	161
Figura III.6:Espectros de massa do pesticida etoprofos	162

Índice de tabelas

Tabela 2.1: Limites impostos pela legislação em vigor para os pesticidas abordados.....	7
Tabela 3.1: Classificação de pesticidas com base no grupo de organismos alvo.....	9
Tabela 3.2: Grupo químico dos pesticidas abordados ao longo do trabalho.....	14
Tabela 3.3: Critérios de classificação quanto ao risco potencial para a saúde humana, segundo a OMS	15
Tabela 3.4: Pesticidas alvo de estudo	18
Tabela 5.1: Modos de operação de um triplo quadrupolo	35
Tabela 8.1: Massa pesada para a preparação das soluções padrão primário e a concentração das mesmas, corrigida com a pureza do padrão comercial	64
Tabela 8.2: Concentração dos pesticidas na solução padrão intermédia I.....	65
Tabela 8.3: Concentração dos pesticidas nas várias soluções padrão de calibração	66
Tabela 8.4: Concentração dos pesticidas na solução padrão conjunta	67
Tabela 8.5: Concentração dos pesticidas na solução padrão intermédia.....	68
Tabela 8.6: Concentração dos pesticidas nas várias soluções padrão de calibração	68
Tabela 8.7: Concentração dos pesticidas na solução padrão conjunta de fortificação ...	69
Tabela 8.8: Concentração dos pesticidas na solução padrão de fortificação.....	69
Tabela 8.9: Concentração dos pesticidas na amostra fortificada.....	70
Tabela 8.10: Voltagem de cone otimizada para a formação dos iões percursoros e energia de colisão aplicada para a formação dos iões de quantificação e confirmação.....	72
Tabela 8.11: Filtros avaliados.....	79
Tabela 9.1: Resumo das condições otimizadas para as transições de MRM1 e MRM2	90
Tabela 9.2: Validação da gama de linearidade para os pesticidas (solvente: água ultrapura)	95
Tabela 9.3: Validação da gama de linearidade para os pesticidas (solvente: água:metanol (9:1), com 0,1 mM de acetato de amónio).....	96
Tabela 9.4: Resultados da aplicação dos testes de Mandel, Rikilt, Áreas normalizadas e homogeneidade de variâncias.....	97
Tabela 9.5: Coeficiente de variação para a transição MRM1, MRM2 e RC para o ensaio de repetibilidade do padrão de calibração mais baixo da curva de calibração	99
Tabela 9.6: Avaliação dos limiares analíticos	99
Tabela 9.7: Recuperação média da fortificação para as várias matrizes e global do método analítico	104

Tabela 9.8: Limite de quantificação do método analítico	105
Tabela 9.9: Incerteza do método analítico	105
Tabela 9.10: Resultados da análise dos MRC	106
Tabela 9.11: Validação da gama de linearidade para os pesticidas	110
Tabela 9.12: Resultados da aplicação dos testes de Mandel e homogeneidade de variâncias	111
Tabela 9.13: Coeficiente de variação obtido pelo ensaio de repetibilidade para a solução padrão de calibração correspondente ao limite inferior da gama de trabalho	112
Tabela 9.14: Avaliação dos limiares analíticos	113
Tabela 9.15: Dados da representação gráfica da Figura 9.24	122
Tabela 9.16: Limite de quantificação do método analítico	123
Tabela 9.17: Incerteza do método analítico	124
Tabela XV.1 Padrões comerciais de pesticidas utilizados	209
Tabela XV.2: Custos associados exclusivamente ao desenvolvimento do método de UPLC-MS/MS	210
Tabela XV.3: Custos associados exclusivamente ao desenvolvimento do método de GC-ECD	211

Abreviaturas e Símbolos

Ø – Diâmetro

μECD – micro-Detector de captura eletrónica (do inglês “*micro-Electron Capture Detector*”)

C18 – Octadecil

C18 (EC) – Octadecil com tratamento *endcap*

CAD – Dissociação por colisão assistida (do inglês “*Collision Assisted Dissociation*”)

CAS – Número de registo de substâncias químicas na base de dados *Chemical Abstracts System*

CV – Coeficiente de Variação

dc – Corrente contínua

DGAV – Direção Geral de Alimentação e Veterinária

ECD – Detetor de captura de eletrónica (do inglês “*Electron Capture Detector*”)

EIL – Ensaio Interlaboratorial

EPAL – Empresa Portuguesa de Águas Livres S.A.

ESI, ESI+, ESI- – Ionização por *electrospray*, positivo ou negativo (do inglês “*Electrospray Ionization*”)

FCUL – Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

GC – Cromatografia Gasosa

GC-μECD – Cromatografia Gasosa com Deteção por Captura micro Eletrónica

GC-ECD – Cromatografia Gasosa com Deteção por Captura Eletrónica

GHS – Sistema de harmonização global (do inglês “*Global Harmonized System*”)

HP-5MS – Coluna cromatográfica Agilent Technologies HP-5MS

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês “*High Performance Liquid Chromatography*”)

ISO – *International Standard Organization*

LC – Cromatografia Líquida (do inglês “*Liquid Chromatography*”)

LD₅₀ – Valor estatístico para a quantidade de um químico necessário para matar 50 % de uma população de animais de teste de dimensão elevada (do inglês “*Lethal Dose*”).

LLE – Extração Líquido-Líquido (do inglês “*Liquid-Liquid Extraction*”)

LOD – Limite de Detecção (do inglês “*Limit of Detection*”)

LOQ – Limite de Quantificação (do inglês “*Limit of Quantification*”)

m/z – razão massa-carga

MRC – Material de Referência Certificado.

MRM – modo de Monitorização de Reações Múltiplas (do inglês “*Multi Reaction Monitoring*”)

MRM1 – Transição de quantificação do modo MRM

MRM2 – Transição de confirmação do modo MRM

MS/MS – Espectrometria de massa acoplada ou *tandem* (do inglês “*tandem mass spectrometry*”)

NQA – Norma de Qualidade Ambiental

NQA-CMA – Norma de Qualidade Ambiental-Concentração Máxima Admissível

NQA-MA – Norma de Qualidade Ambiental-Média Anual

OMS – Organização Mundial de Saúde

PG – Valor teste no método de homogeneidade de variâncias.

r ou ρ – coeficiente de correlação linear

RC ou MRM1/MRM2 – Razão de confirmação, ou razão entre as transições de quantificação e confirmação

rf – Radiofrequência

SIM – Monitorização de iões selecionados (do inglês “*selected Ion Monitoring*”)

SPE – Extração em Fase Sólida (do inglês “*Solid Phase Extraction*”)

tr – tempo de retenção

UPLC – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (do inglês “*Ultra Performance Liquid Chromatography*”)

UPLC-MS/MS – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência associada à espectrometria de massa *tandem* (do inglês “*Ultra Performance Liquid Chromatography – tandem mass spectrometry*”)

VP – Valor Paramétrico

VT – Valor Teste, no teste de Mandel

Zebron – Coluna cromatográfica Phenomenex Zebron ZB-MultiResidue-2

1 Água

A água para consumo humano é um bem escasso, sendo inferior a 1 % da água existente no planeta ^[1].

Desde os tempos mais remotos que o homem reconhece a necessidade de submeter a água doce a processos que a tornam própria para consumo. Evidências deste facto podem ser encontradas num texto médico apócrifo datado de 2000 A.C. que refere que a água devia de ser filtrada ou fervida antes de consumida. Com o avanço da civilização humana e com a sua atividade a causar um impacto cada vez maior no meio ambiente também as reservas de água e em especial as reservas de água doce sofrem este efeito negativo ^[2].

Devido à existência de novos poluentes como novos pesticidas, existe a necessidade de criar técnicas capazes de monitorizar a qualidade da água para consumo humano, de forma a poder garantir que a água que é distribuída apresenta um elevado grau de qualidade e não possui risco para a saúde humana. No entanto também é necessário garantir que as reservas de água tanto superficiais como subterrâneas apresentem um elevado grau de qualidade de forma a garantir que o meio ambiente não se degrade mais. Por outro lado, a qualidade destas águas também pode afetar a qualidade da água para consumo no futuro, pois estas são as reservas de água para consumo. O presente trabalho pretende ser mais um passo neste sentido de garantir a qualidade da água pelo controlo de vários pesticidas que são potenciais poluentes do meio hídrico.

2 EPAL ^[3]

A EPAL – Empresa Portuguesa de Águas Livres, S.A. existe desde 1868, sendo na altura designada como CAL – Companhia de Águas de Lisboa. No entanto, as alterações de nome nunca alteraram a visão de futuro com o objetivo de crescer e garantir um serviço de excelência e com elevada qualidade, sendo hoje uma empresa líder e que procura continuar a desenvolver formas de promover a utilização responsável e eficiente da água, bem como a preservação desta tanto pelo controlo da qualidade da água para consumo, das captações superficiais e subterrâneas, como pela proteção destas reservas de água.

Devido à EPAL colocar uma elevada importância em fornecer um serviço eficaz mas ao mesmo tempo com grande qualidade, existe a necessidade de avaliar vários parâmetros da água para consumo, assim como nas suas captações de água. É a Direcção de Controlo da Qualidade da Água (LAB) da EPAL, que teve a sua origem no laboratório criado na empresa na década de 1930, que cabe executar as análises necessárias para garantir o controlo da água desde as captações até à torneira do consumidor. Cabe também a esta direcção a responsabilidade de desenvolver novos métodos analíticos sempre que a legislação nacional ou europeia impõe a monitorização de novos compostos ou quando requer um limite de quantificação mais baixo do que o do método já existente em LAB para o mesmo composto.

De forma a conseguir atingir o elevado grau de exigência no controlo das águas, o laboratório engloba um conjunto de técnicos altamente qualificados, bem como equipamentos de última geração, que permitem análises de controlo de qualidade da água rápidas e com elevada sensibilidade.

A Direcção de Controlo da Qualidade da Água da EPAL está acreditada desde 1999, segundo a Norma NP EN ISO/IEC 17025 - “Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração”. Esta acreditação abrange a análise de 110 parâmetros de qualidade da água (198 compostos), 135 métodos analíticos para ensaios de amostras d água, bem como 6 normas/métodos para ensaios a materiais orgânicos em contacto com água para consumo humano, sendo um dos dois laboratórios com esta última acreditação a nível nacional.

Para além desta focagem na qualidade do serviço prestado, a EPAL também promove vários projetos em parceria com entidades externas como o caso do presente trabalho, possibilitando a existência de estágios enquanto alarga a criação de conhecimento para o controlo de novos poluentes nas águas.

3 Pesticidas

Desde há vários milénios o homem tem recorrido ao uso de pesticidas, normalmente recorrendo a algo (plantas ou compostos químicos inorgânicos, mas não só), para tentar afastar ou matar outro animal ou planta que prejudique as suas colheitas ou o seu bem-estar.

Como pesticidas podem ser consideradas todas e quaisquer substâncias químicas destinadas a incapacitar, eliminar ou repelir pestes, ou seja, quaisquer animais com impacto negativo para o homem ou para a sua atividade ^[4]. Pesticidas são também as substâncias utilizadas para controlar o crescimento da planta, eliminar ou evitar o crescimento de ervas daninhas, e preservar a planta ^[5].

Os pesticidas para além da sua aplicação na agricultura também possuem aplicações como fármacos utilizados em veterinária animal. Existe ainda um ou outro caso em que um pesticida pode também encontrar uso em medicina como o caso do inseticida DDT (1,1'-(2,2,2-tricloroetilideno)bis(4-clorobenzeno)), que foi utilizado para combater os insetos responsáveis por transmitir o vírus da malária ^[6]. Para além disto existem pesticidas que podem encontrar utilização em mais do que uma área, como a mistura isomérica de alfa-cipermetrina, que pode ser utilizada como inseticida tanto na agricultura como em veterinária.

Devido ao aparecimento de um número cada vez maior de pesticidas que são ambientalmente mais seguros que os pesticidas antigos, e devido ao nome Pesticida estar muito associado a algo perigoso, começou a aparecer um novo termo para estes, sendo hoje em dia os pesticidas de utilização agrícola chamados de Fitofármacos. Esta definição abrange todos os pesticidas, exceto aqueles usados fora da agricultura, embora muitos pesticidas utilizados em veterinária também sejam utilizados em agricultura ^[7]. O nome Pesticida mantém-se quando se fala dos resíduos de pesticidas, ou de pesticidas no geral, não estando limitado a um campo de aplicação específico.

3.1 Legislação

A legislação respeitante ao uso de fitofármacos e aos resíduos de pesticidas começou a ser criada a partir do momento em que se verificou que estes poderiam ser prejudiciais para a saúde, tendo evoluído muito nas últimas décadas. À medida que a tecnologia de fitofármacos evoluiu, e o conhecimento dos efeitos destes no ambiente foi aumentando, mais restritas se tornam as condições para o uso de fitofármacos, e mais intensivo e exigente passa a ser o controlo dos resíduos de pesticidas no ambiente.

Desta forma, começaram-se a criar planos de ação a nível nacional e internacional para a utilização de produtos fitofarmacêuticos e para a monitorização dos resíduos de pesticidas nas águas tanto continentais como costeiras. Em Portugal a entidade reguladora é a Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), sendo responsável por autorizar a comercialização dos fitofármacos, bem como de fiscalizar o plano de ação nacional para a utilização sustentável de fitofármacos.

Atualmente a comercialização ou proibição da mesma é feita de acordo com o Decreto-lei nº 26/2013 de 11 de Abril, que transpõe a diretiva europeia nº 2009/128/CE que regula a nível europeu este setor, que é a mais recente diretiva para o uso de pesticidas na União Europeia. É cada vez mais frequente a publicação de normas europeias com o intuito de proibir a comercialização e utilização de diversos fitofármacos. Esta legislação e outras ações têm como principal intuito o uso responsável de fitofármacos e a implementação de planos de proteção integrada, de forma a reduzir o uso de fitofármacos ao máximo.

Da mesma forma que para o uso dos fitofármacos, também existe um plano de ação para a monitorização e controlo da quantidade de resíduos de pesticidas presentes na água, com especial importância para a qualidade da água para consumo, pois é de grande importância garantir que a água é segura para consumo humano.

Nas últimas décadas esta área começou a ter mais relevância, pois muitos fitofármacos foram utilizados em quantidades muito grandes ao longo do século XX, e muitos destes têm um elevado grau de persistência no ambiente, sendo que vários também possuem um grau significativo de bioacumulação. Isto é de elevada importância, uma vez que a água para consumo é cada vez mais um bem escasso, e fenómenos de

bioacumulação podem eles mesmos degradar o ambiente aquático, por eliminação de organismos aquáticos que têm um efeito positivo na preservação da água.

A “Diretiva do Quadro da Água” (“*Water Framework Directive*”) 2000/60/EC estabeleceu o primeiro grupo de substâncias prioritárias no domínio da água que necessitam monitorização, bem como o limite máximo admissível para cada uma destas. Esta Diretiva Quadro da Água foi transposta para a legislação nacional através do Decreto-lei nº 58/2005 de 29 de Dezembro, efetuando a gestão sustentável de águas superficiais e subterrâneas. A última revisão desta diretiva é a Diretiva 2013/39/EU de 12 de Agosto, a qual menciona novas substâncias prioritárias a monitorizar em águas superficiais.

Para assegurar a qualidade da água para consumo foi criada inicialmente a diretiva 80/778/EEC que estipulou vários parâmetros de qualidade da água para consumo, entre os quais, os primeiros limites máximos admissíveis para resíduos de pesticidas na água para consumo, não definindo se os metabolitos também deveriam ser incluídos. Mais tarde apareceu a Diretiva 98/83/EC de 3 de Novembro, onde se começaram a delinear as regras para assegurar a qualidade da água, para além da água para consumo. Esta diretiva foi transposta para a legislação nacional através do Decreto-Lei nº 243/2005 de 5 de Setembro. Este mesmo Decreto-Lei refere que um pesticida é definido como os resíduos de pesticidas, os metabolitos destes, e os produtos de regulação de plantas, sendo exigido um limite de deteção igual ou inferior a 25 % do valor paramétrico. Este Decreto-Lei foi revogado pelo Decreto-Lei nº 306/2007 de 27 de Agosto o qual refere que o limite máximo admissível para pesticidas individuais e para pesticidas totais em água para consumo humano é de 0,1 µg/l para pesticidas individuais, e 0,5 µg/l para pesticidas totais.

Para águas superficiais e subterrâneas estão definidos no Decreto-lei nº 103/2010 de 24 de Setembro valores específicos para várias substâncias prioritárias, sendo que para estas é exigida a incerteza expandida inferior a 50 % quando calculada com um fator de expansão de 2, a uma concentração correspondente a 30 % do valor da norma de qualidade ambiental deste.

Este presente trabalho encontra-se enquadrado tanto na Diretiva 2013/39/EU de 12 de Agosto, como no Decreto-lei nº 306/2007 de 27 de Agosto. Na Tabela 3.1

apresentam-se os pesticidas abordados neste trabalho, bem como o limite de quantificação requerido pela legislação.

Tabela 3.1: Limites impostos pela legislação em vigor para os pesticidas abordados.

Pesticida	2013/39/EU		DL 306/2007
	NQA-CMA ¹ (µg/l)	NQA-MA ² (µg/l)	VP ³ (µg/l)
Aclonifena	0,12	0,12	
Azoxistrobina	–		
Bifenox	0,04	0,012	
Cipermetrina⁴	6×10^{-4}	8×10^{-5}	
Deltametrina	–		
Diclorvos	7×10^{-4}	6×10^{-4}	
Dicofol	não aplicável ⁵	$1,3 \times 10^{-3}$	0,1
Etoprofos	–		
Iprodiona	–		
Metomil	–		
Ometoato	–		
Quinoxifena	2,7	0,15	
Terbutrina	0,34	0,065	
Tiodicarbe	–		

¹ NQA-CMA – Norma de Qualidade Ambiental – Concentração Máxima Admissível.

² NQA-MA – Norma de Qualidade Ambiental – Média Anual.

³ VP – Valor Paramétrico.

⁴ Soma das misturas isoméricas alfa-cipermetrina, beta-cipermetrina, teta-cipermetrina, e zeta-cipermetrina.

⁵ Não existe informação suficiente para definir um NQA-CMA para este composto.

3.2 Classificação

Os pesticidas podem ser classificados e agrupados de diversas formas, sendo as mais comuns, pelo tipo de alvo a que se destinam ou por origem e grupo químico. Por vezes, quando se faz a classificação com base no alvo a que se destinam também se faz a distinção entre pesticidas naturais, químicos sintéticos ou inorgânicos. A definição de pesticidas naturais diz respeito à utilização de substâncias extraídas de animais ou plantas existentes na natureza, ou a introdução de outras espécies para a erradicação de uma peste.

Os pesticidas químicos sintéticos são as substâncias sintetizadas com a finalidade de matar ou inibir uma determinada peste, podendo alguns destes ser inspirados em moléculas existentes na natureza. Os pesticidas químicos inorgânicos são substâncias inorgânicas com carácter de pesticida, como o caso do enxofre.

No entanto existem outras formas de classificar os pesticidas, sendo que a Organização Mundial de Saúde (OMS) e o Sistema de Harmonização Global (GHS) sugerem que esta classificação seja feita com base no perigo que o pesticida representa para o ser humano^[8].

Os pesticidas ainda podem ser separados consoante o seu modo de ação, ou seja, como específicos ou não específicos, quando o alvo é apenas uma espécie ou várias, como sistémicos ou não sistémicos, no caso de o pesticida deslocar-se ou não ao longo da planta, ou como pesticidas de contacto ou de ação sobre o estômago, entre outras formas específicas de os classificar.

3.2.1 Classificação consoante o tipo de organismo alvo

A classificação dos pesticidas feita com base no alvo a que este se destina pode ser muito extensa, estando na Tabela 3.2 um conjunto dos grupos alvo mais comuns e do qual os pesticidas que se otimizaram ao longo deste trabalho fazem parte^[9]. No entanto muitos pesticidas podem apresentar capacidades de combater mais do que um tipo de peste alvo, sendo normalmente agrupados vários sob o mesmo nome, como é o caso dos acaricidas, ovicidas e nematocidas, muitas vezes agrupados no conjunto dos inseticidas, dado esta ser normalmente a sua função pesticida principal.

Tabela 3.2: Classificação de pesticidas com base no grupo de organismos alvo.

Classificação	Grupo
Algicidas	Algas
Antimicrobianas	Microrganismos como bactérias e vírus
Fungicidas	Fungos
Herbicidas	Plantas indesejáveis
Inseticidas	Insetos
Acaricidas	Ácaros
Moluscicidas	Moluscos
Nematocida	Nematóides
Rodenticidas	Roedores
Ovicidas	Ovos de insetos, ácaros e moluscos
Desinfetantes	Bactérias
Agentes de proteção da planta	–
Reguladores de crescimento	–

3.2.1.1 *Acaricidas*^[10]

Acaricidas são o conjunto de pesticidas destinado a combater ácaros, incluindo tanto ácaros como aranhas.

Os acaricidas sintéticos podem ser de diversos grupos químicos e maioritariamente são inseticidas com propriedades acaricidas. Alguns destes grupos são, os organofosforados, os carbamatos, os piretróides, as formamidinas, os éteres nitrofenílicos, e os derivados halogenados do benzimidazol.

Dos pesticidas abordados neste trabalho, os que apresentam atividade como acaricida são o diclorvos, o dicofol, o metomil e o ometoato.

3.2.1.2 *Fungicidas*^[11]

Fungicidas são o conjunto de pesticidas destinado a combater fungos que podem atacar as plantas, tanto a nível foliar, como a nível da raiz. Os fungicidas podem ser de origem inorgânica, natural ou sintética.

Vários fungicidas sintéticos utilizados hoje em dia são baseados em fungicidas naturais produzidos por outros fungos ou plantas, como as estrobilurinas. No entanto, os fungicidas sintéticos mais antigos não foram baseados em fungicidas naturais, pertencendo ao grupo químico das dicarboximidas, quinolinas, tiocarbamatos, entre outros.

Para além destes também existem fungicidas usados para tratamento em medicina humana e veterinária, sendo estes, uma seleção mais específica e menos tóxica para o homem ou animal.

Este grupo de pesticidas é um dos 3 mais importantes, sendo que os outros 2 são os herbicidas e os inseticidas. A importância deste grupo deve-se em grande parte ao cultivo de cereais e árvores de fruto, dado a sua grande suscetibilidade ao ataque de fungos.

Dos pesticidas abordados neste trabalho, os que apresentam atividade como fungicidas são a azoxistrobina, a iprodiona e a quinoxifena.

3.2.1.3 *Herbicidas*^[5]

Herbicidas são o conjunto de fitofármacos destinado ao combate de ervas daninhas, podendo definir-se erva daninha como uma planta que se encontra no local errado, ou uma planta cuja ação prejudicial é superior ao seu valor positivo.

Os herbicidas têm especial importância no cultivo de produtos vegetais e cereais, uma vez que as ervas daninhas prejudicam a produção destes por competição direta pelos nutrientes da terra.

Os herbicidas podem ser de origem inorgânica, biológicos ou sintéticos. Os herbicidas sintéticos podem ser de diversas famílias, como triazinas, éteres difenilicos, cloroacetanilidas, ureia, imidazolinonas, entre outras.

Dos pesticidas abordados neste trabalho, os que apresentam atividade como herbicida são a aclonifena, o bifenoX e a terbutrina.

3.2.1.4 *Inseticidas*^[12]

Inseticidas são o conjunto de pesticidas destinado a combater pragas de insetos. São de elevada importância, dado que os insetos são capazes de fazer grandes estragos nas colheitas, como também podem ser portadores de vírus que afetam o homem ou várias espécies animais de interesse. O facto de vários inseticidas também apresentarem características de ovicida, moluscicida ou acaricida faz com que este seja um dos grupos de pesticidas mais utilizado mundialmente.

Os inseticidas podem ser de origem inorgânica, natural e sintéticos. Os inseticidas inorgânicos eram à base de compostos de arsénio, cobre, chumbo ou fluorsilicatos, sendo que a maioria destes já não é utilizado hoje em dia.

Exemplos de inseticidas de origem natural, extraídos de plantas, são os neonicotinóides e os piretróides.

Alguns exemplos de grupos de inseticidas sintéticos são os dinitrofenóis, organoclorados, organofosforados e carbamatos. Para além destes, mais recentemente começaram a aparecer inseticidas sintéticos baseados no inseticida natural *pyrethrum*, o que deu origem ao aparecimento de diversos novos grupos de inseticidas, os quais possuem um maior carácter inseticida e algumas propriedades melhoradas em relação ao pesticida natural, como uma maior resistência à luz solar. Alguns exemplos destes novos grupos são os crisantemato (ésteres) e análogos destes, podendo ser agrupados como piretróides sintéticos.

Dos pesticidas abordados neste trabalho, os que apresentam atividade como inseticida são a alfa-cipermetrina, a beta-cipermetrina, a teta-cipermetrina, a zeta-cipermetrina, a deltametrina, o diclorvos, o etoprofos, o metomil, o ometoato, e o tiodicarbe.

3.2.1.5 *Moluscidas* ^[13]

Moluscidas são o conjunto de fitofármacos usados para combater moluscos, especialmente caracóis e lesmas, mas não só. Estes podem ser pesticidas inorgânicos, biológicos ou sintéticos, sendo que muitos são inseticidas que também apresentam ação moluscicida.

Um pouco à semelhança dos acaricidas, os moluscidas sintéticos também pertencem aos mesmos grupos químicos que alguns inseticidas e acaricidas, como os carbamatos.

Dos pesticidas abordados neste trabalho, o único que apresenta atividade como moluscicida é o tiodicarbe.

3.2.1.6 *Nematocidas* ^[14]

Nematocidas são o conjunto de fitofármacos que se destina ao combate de nematóides. Os nematóides são seres cilíndricos, parecidos com minhocas de dimensões microscópicas que são parasitas das plantas.

Os nematocidas sintéticos podem ser agrupados em 3 grupos químicos, podendo ser fumigantes, organofosforados ou carbamatos. Fumigantes são nematocidas com uma estrutura química simples, que possuem baixo ponto de ebulição e elevada pressão de vapor.

Os organofosforados e os carbamatos são nematocidas mais recentes, sendo que a sua grande vantagem sobre os fumigantes é de que estes são melhor tolerados pelas plantas.

Dos pesticidas abordados neste trabalho, o único que apresenta atividade como nematocida é o etoprofos.

3.2.1.7 *Ovicidas* ^[10] ^[12]

Ovicidas são o conjunto de pesticidas que se destina a eliminar ovos de insetos, ácaros, aracnídeos e moluscos. Apenas alguns inseticidas, acaricidas e moluscicidas possuem a capacidade de ovicida, pelo que os ovicidas podem ser considerado um subgrupo destes.

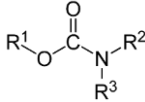
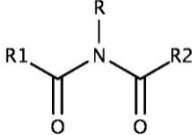
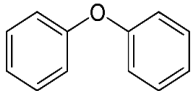
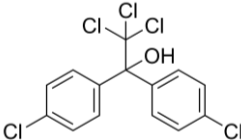
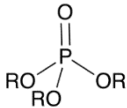
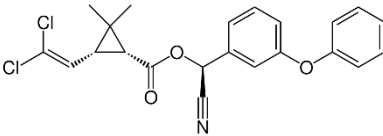
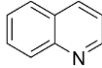
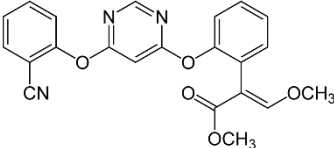

Alguns dos grupos químicos a que pertencem os pesticidas com atividade ovicida são as formamidinas, os clorofenóis e os carbamatos.

Dos pesticidas abordados neste trabalho, o único que apresenta atividade como acaricida é o tiodicarbe.

3.2.2 **Classificação com base na origem química** ^[10] ^[15] ^[16]

A classificação dos pesticidas por grupo químico característico é vasta, sendo que os maiores grupos de pesticidas são os organoclorados, organofosforados e carbamatos. Existem também cada vez mais pesticidas inspirados em pesticidas naturais, os quais visam melhorar a sua eficiência, mantendo as características que os tornam ambientalmente mais seguros. Na Tabela 3.3 apresentam-se as classes químicas às quais pertencem os vários pesticidas abordados neste trabalho.

Tabela 3.3: Grupo químico dos pesticidas abordados ao longo do trabalho^[17].

Grupo químico	Estrutura geral ou exemplo	Pesticida
Carbamatos ¹		Metomil Tiodicarbe
Dicarboximidas		Iprodiona
Éteres Difenílicos		Aclonifena Bifenox
Organoclorados ²		Dicofol
Organofosforados		Diclorvos Etoprofos Ometoato
Piretróides ³		alfa-Cipermetrina beta-Cipermetrina teta-Cipermetrina zeta-Cipermetrina Deltametrina
Quinolinas		Quinoxifena
Estrobilurinas ⁴		Azoxistrobina
Triazinas		Terbutrina

¹ O grupo R¹ pode ser um grupo metilo (inseticidas), aromático (herbicidas), ou benzamitazóico (fungicidas); R² e R³ podem ser uma cadeia alifática ou um grupo aromático.

² Estrutura do dicofol como exemplo.

³ Estrutura geral da cipermetrina como exemplo.

⁴ Estrutura da azoxistrobina como exemplo.

3.2.2.1 *Metabolitos*

Embora não sendo um grupo químico, os metabolitos podem ser considerados como uma classe que agrupa todas as substâncias que resultam da degradação de outras substâncias, seja por reação com o meio ambiente, como hidrólise ou fotólise, seja por digestão por parte de um organismo vivo.

Os metabolitos aqui considerados limitam-se a produtos de degradação de pesticidas, sejam estes naturais ou sintéticos, pois tanto os pesticidas como vários dos seus produtos de degradação possuem um impacto negativo no ambiente.

Dos pesticidas estudados neste trabalho, existem alguns que são metabolitos relevantes de outros pesticidas ou que possuem metabolitos relevantes. São eles, o pesticida ometoato que é um metabolito do pesticida dimetoato, o pesticida metomil que é o metabolito principal do pesticida tiodicarbe, o pesticida diclorvos que é um metabolito dos pesticidas naled e triclorfão, e o pesticida deltametrina que é metabolito principal do pesticida tralometrina^[15].

3.2.3 *Classificação com base no risco potencial para a saúde humana*^[8]

Esta classificação é principalmente feita com recurso aos valores estatísticos de dose letal para 50 % da população teste (LD₅₀), em curto espaço de tempo de exposição, por ingestão oral ou por absorção dérmica, se este processo for inferior. O modo de classificar os pesticidas com base no risco potencial para a saúde humana recomendado pela OMS foi adaptado do modo de classificação da GHS de forma a uniformizar as duas recomendações, encontrando-se na Tabela 3.4 os seus critérios de classificação.

Tabela 3.4: Critérios de classificação quanto ao risco potencial para a saúde humana, segundo a OMS.

Classificação	LD ₅₀ em ratos (mg/kg peso corporal)	
	Oral	Dérmica
Ia Extremamente perigoso	< 5	< 50
Ib Altamente perigoso	5 – 50	50 – 200
II Moderadamente perigoso	50 – 2000	200 – 2000
III Ligeiramente perigosos		> 2000
U Improvável que cause perigo agudo		> 5000

Estando o modo de avaliar o valor de LD₅₀ para misturas de pesticidas no guia da OMS “*The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2009*”.

Os principais problemas deste modo de classificação são de que não tem em conta os riscos associados ao solvente, podendo este por vezes ser mais perigoso para o homem do que os pesticidas que constituem a mistura. Além disso, uma vez que só se tem em conta uma única forma de exposição e devido à exposição pelas várias vias poder ser cumulativa, uma concentração inferior poderá já ser prejudicial a saúde.

3.3 Utilização em medicina veterinária

Embora a medicina veterinária seja uma área da medicina, esta também usa diversos pesticidas, maioritariamente fungicidas ou inseticidas com o objetivo de tratar e proteger os animais.

Devido aos requisitos especiais que os pesticidas necessitam cumprir para poderem ser aplicados nesta área, o seu grupo não é muito alargado, sendo que dos pesticidas abordados neste trabalho, a alfa-cipermetrina, a beta-cipermetrina e a deltametrina também são aplicados nesta área.

3.4 Vantagens e desvantagens

As vantagens dos pesticidas são de certa forma bastante evidentes, devido a que estes permitem proteger tanto as plantas como pessoas e animais de ataques de insetos e fungos, que podem provocar doenças. Para além deste efeito de proteção da saúde, muitos pesticidas permitem eliminar ervas daninhas que podem provocar grandes danos nas colheitas, sendo esta a principal vantagem, pois sem o recurso a pesticidas, não seria possível obter o grande nível de produção agrícola atual.

As grandes desvantagens do uso dos fitofármacos são de que muitos são pouco seletivos, são relativamente persistentes nos solos ou na água e alguns possuem elevada toxicidade, especialmente para organismos aquáticos. Devido à baixa seletividade, muitos pesticidas podem eliminar para além da peste alvo, outros animais ou plantas que seriam benéficos para a sua produção, e sendo persistentes, podem ainda apresentar um risco potencial para a saúde pública devido à sua toxicidade para o homem, e também para o meio-ambiente.

Outro grande problema do uso extensivo de pesticidas é o surgimento de pestes resistentes ao pesticida em questão, ou resistentes a mais do que um pesticida, o que leva à redução da eficiência deste e à necessidade de utilizar novos pesticidas.

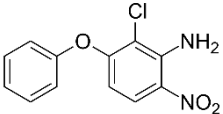
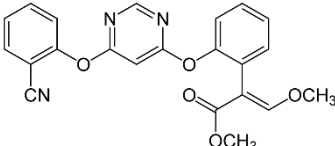
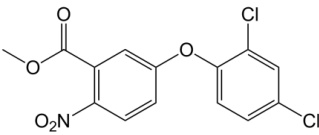
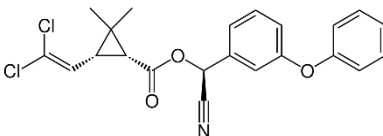
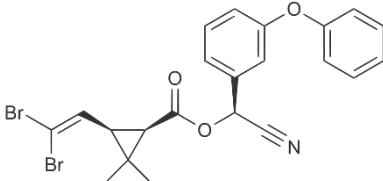
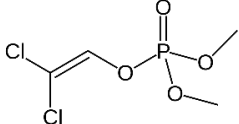
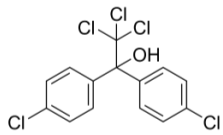
O aparecimento de novos pesticidas mais eficientes de origem natural ajuda a reduzir a quantidade necessária de pesticidas a aplicar, e desta forma também reduz os resíduos de pesticidas produzidos. Por outro lado, estes são normalmente muito tóxicos para o ambiente aquático, e apresentam algum nível de persistência no meio ambiente, sendo no entanto normalmente menos persistentes que os pesticidas químicos tradicionais.

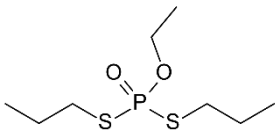
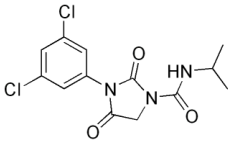
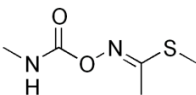
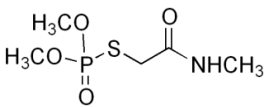
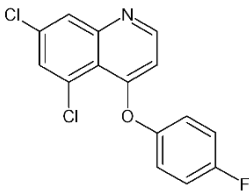
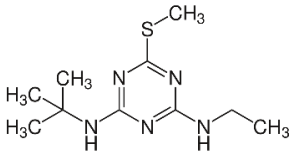
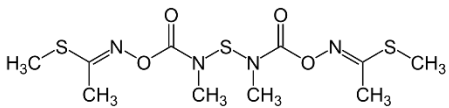
Como forma de reduzir o uso de pesticidas surgiu nas últimas décadas o conceito de proteção integrada da planta, no qual se avalia qual, como, quando e quanto pesticida se deve aplicar para combater uma determinada praga da forma mais eficaz possível, sendo que nesta prática de cultivo se guardam os pesticidas como última medida de combate à praga.

3.5 Pesticidas que foram alvo do estudo

Na Tabela 3.5 apresentam-se os pesticidas abordados neste estudo, juntamente como o seu número de registo CAS, estrutura química, tipo de pesticida e grupo químico a que pertencem.

Tabela 3.5: Pesticidas alvo de estudo^{[15][17][18]}.

Pesticida	CAS*	Estrutura química	Tipo de Pesticida	Classe por grupo químico
Aclonifena	74070-46-5		• Herbicida	Éter difenilico
Azoxistrobina	131860-33-8		• Fungicida	Estrobilurinas
Bifenox	42576-02-3		• Herbicida	Éter difenilico
Cipermetrina	alfa 67375-30-8		• Inseticida • Medicina veterinária	Piretróides
	beta 72204-43-4		• Inseticida • Medicina veterinária	Piretróides
	teta 71697-59-1		• Inseticida	Piretróides
	zeta 1315501-18-8		• Inseticida	Piretróides
Deltametrina	52918-63-5		• Inseticida • Medicina veterinária • Metabolito	Piretróides
Diclorvos	62-73-7		• Inseticida • Acaricida • Metabolito	Organofosforados
Dicofol	115-32-2		• Acaricida	Organoclorados

Pesticida	CAS*	Estrutura química	Tipo de Pesticida	Classe por grupo químico
Etoprofos	13194-48-4		<ul style="list-style-type: none"> • Inseticida • Nematocida 	Organofosforados
Iprodiona	36734-19-7		<ul style="list-style-type: none"> • Fungicida 	Dicarboximida
Metomil	16752-77-5		<ul style="list-style-type: none"> • Inseticida • Acaricida • Metabolito 	Carbamato
Ometoato	1113-02-6		<ul style="list-style-type: none"> • Inseticida • Acaricida • Metabolito 	Organofosforados
Quinoxifena	124495-18-7		<ul style="list-style-type: none"> • Fungicida 	Quinolina
Terbutrina	886-50-0		<ul style="list-style-type: none"> • Herbicida 	Triazina
Tiodicarbe	59669-26-0		<ul style="list-style-type: none"> • Inseticida • Acaricida • Ovicida 	Carbamato

* Os números CAS são os números fornecidos com os certificados. Para o pesticida deltametrina, existem 2 números CAS diferentes correspondentes aos dois isômeros; para os pesticidas cipermetrina existem vários números CAS, sendo o número genérico da mistura estereoquímica não definida 52315-07-8. Por vezes, este ou outros números não mencionados podem aparecer relacionados com a composição associada à beta-cipermetrina ou à zeta-cipermetrina, sendo estes números referentes a um dos isômeros da mistura, podendo ser o número CAS genérico da mistura estereoquímica não definida, ou números CAS obsoletos para estes pesticidas.

4 Método cromatográfico

4.1 Geral ^[19]

A cromatografia é um método físico de separação no qual os compostos a serem separados são distribuídos entre duas fases, uma das quais está estacionária, a fase estacionária e a outra se move numa dada direção, a fase móvel. Permitindo numa única injeção a separação dos compostos e também a avaliação quantitativa de cada constituinte de uma amostra. O tempo entre a injeção cromatográfica e a detecção do soluto é chamado de tempo de retenção, t_r .

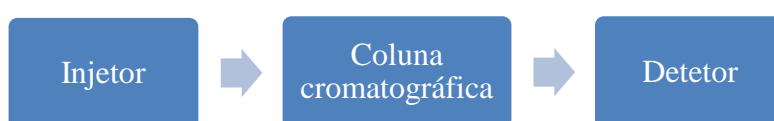


Figura 4.1: Esquema geral de um equipamento de cromatografia.

Dependendo da fase estacionária pode-se executar cromatografia de adsorção quando se utiliza uma fase estacionária sólida, ou de partição quando se utiliza uma fase estacionária líquida. Na cromatografia de adsorção as separações ocorrem através do estabelecimento de forças de van der Waals e de interações electrostáticas entre a fase estacionária e os compostos presentes na mistura. Na cromatografia de partição a separação é feita com base na diferença de solubilidade dos compostos entre a fase estacionária líquida e a fase móvel.

Na cromatografia líquida a fase móvel ou eluente serve para arrastar os solutos pela coluna, podendo ser constituída por um único solvente ou por uma mistura de solventes com uma composição constante (eluição isocrática), ou com recurso a um gradiente de concentrações, de forma a promover uma melhor e mais rápida separação dos solutos. Na cromatografia gasosa a fase móvel serve apenas para promover o arraste dos solutos ao longo da coluna, não interferindo com a separação cromatográfica destes, sendo normalmente designada por gás de arraste. A separação cromatográfica nesta técnica é normalmente feita através de uma sequência de temperatura programada (rampa de temperatura) de um forno onde se encontra a coluna cromatográfica.

Normalmente dá-se preferência à cromatografia gasosa, uma vez que esta produz menos resíduos. No entanto, muitos dos pesticidas são pouco voláteis ou degradam-se com a temperatura, o que faz com que a cromatografia líquida seja a forma ideal para os analisar.

- Constante de distribuição ou partição, K

A cromatografia de partição baseia-se no equilíbrio dinâmico do soluto entre a fase estacionária líquida e a fase móvel. Este equilíbrio pode ser representado pelo coeficiente de partição K , dado por:

$$K = \frac{C_s}{C_m} \quad \text{Equação 4.1}$$

Onde C_s e C_m são respetivamente a concentração do analito na fase estacionária e na fase móvel.

De acordo com a Equação 4.1, quanto maior for o valor de K , mais afinidade tem o analito para a fase estacionária, o que se traduz num tempo de retenção mais elevado. Este parâmetro depende da composição da fase estacionária, fase móvel, temperatura e natureza do analito.

- Fator de retenção ou capacidade, k

Este fator é uma medida do tempo que cada analito permanece na fase estacionária, sendo tanto maior quanto maior o tempo de retenção. Este fator pode ser calculado pela Equação 4.2, onde t_0 é o tempo decorrido desde o início da injeção cromatográfica até à deteção de um composto que não fique retido na fase estacionária (normalmente o solvente), sendo o tempo de retenção deste composto denominado de “tempo morto”.

$$k = \frac{tr - t_0}{t_0} \quad \text{Equação 4.2}$$

- Fator de separação, α

Com base no fator de retenção é possível avaliar o fator de separação, que estima o afastamento de 2 picos adjacentes. Este fator pode ser calculado com recurso à Equação 4.3, sendo $k(A)$ o fator de retenção do analito mais retido e $k(B)$ do analito menos retido.

$$\alpha = \frac{k(A)}{k(B)} \quad \text{Equação 4.3}$$

- Eficiência

A eficiência da coluna é expressa como o número de pratos teóricos N da coluna, ou seja, o número de equilíbrios que é possível estabelecer ao longo da coluna, sendo que a coluna é mais eficiente quanto maior for o valor de N .

O número de pratos teóricos pode ser calculado pela Equação 4.4, onde L é o comprimento da coluna e H é a altura equivalente do prato teórico, ou seja, a distância no interior da coluna necessária para se estabelecer um equilíbrio. Desta forma, quanto menor for a altura equivalente do prato teórico, maior é a eficiência e mais estreitos são os picos cromatográficos.

$$N = \frac{L}{H} \quad \text{Equação 4.4}$$

Esta equação também pode ser escrita em função do tempo de retenção e da largura do pico na base de acordo com a Equação 4.5, ou largura a meia altura de acordo com a Equação 4.6.

$$N = \frac{16tr^2}{w^2} \quad \text{Equação 4.5}$$

$$N = \frac{5,55tr^2}{w_{1/2}^2} \quad \text{Equação 4.6}$$

- Resolução, R_s

A resolução de uma coluna cromatográfica pode ser definida como a distância entre 2 picos adjacentes num cromatograma. Este parâmetro pode ser calculado com recurso à Equação 4.7 onde \bar{w} é a média da largura dos picos na base e Δtr a diferença entre os tempos de retenção, ou pela Equação 4.8, onde $\overline{w_{1/2}}$ é a média da largura dos picos a meia altura. De uma forma geral se o valor de $R_s \geq 1,5$ existe separação total dos picos cromatográficos.

$$R_s = \frac{\Delta tr}{\bar{w}} \quad \text{Equação 4.7}$$

$$R_s = \frac{0,589 \times \Delta tr}{\overline{w_{1/2}}} \quad \text{Equação 4.8}$$

4.1.1 Colunas

Em cromatografia existem 2 tipos gerais de colunas: colunas tubulares abertas e colunas fechadas com enchimento.

As colunas tubulares abertas são normalmente utilizadas em cromatografia gasosa e as colunas fechadas com enchimento são normalmente usadas em cromatografia líquida.

4.1.1.1 Colunas cromatográficas fechadas com enchimento

Estas colunas são normalmente utilizadas em cromatografia líquida devido aos líquidos possuírem um coeficiente de difusão muito baixo quando comparado com os gases.

Com estas colunas a distância que o soluto normalmente necessita de percorrer é muito mais reduzida uma vez que as colunas normalmente possuem 5 a 30 cm de comprimento. Estas possuem no seu interior partículas microporosas de um sólido (geralmente sílica) com cerca de 1 a 5 μm de diâmetro, que podem servir de fase estacionária ou como suporte da fase estacionária. Até há pouco tempo as colunas cromatográficas possuíam um diâmetro de 4,6 mm, começando agora a ser mais comum o diâmetro 2,1 mm, sendo estas mais compatíveis com os detetores de espectrometria de massa, uma vez que estes requerem um caudal baixo de solvente.

Quando se utiliza uma elevada pressão e colunas com partículas de cerca de 1,7 μm de diâmetro, obtém-se o que é normalmente apelidado de cromatografia líquida de ultra eficiência, sendo estes os equipamentos de cromatografia líquida com a maior resolução.

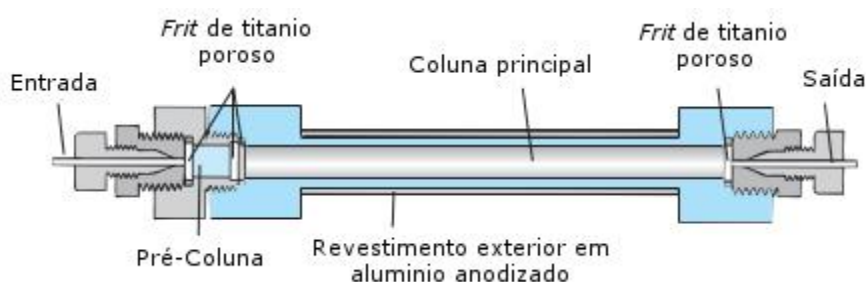


Figura 4.2: Esquema de uma coluna cromatográfica fechada usada em cromatografia líquida^[19].

Consoante a fase estacionária é mais polar ou mais apolar, estas colunas podem ser divididas em colunas de fase normal (colunas polares) ou colunas de fase reversa (colunas apolares e pouco polares).

O enchimento das colunas pode ser de diversos materiais, sendo o mais comum esferas de sílica microporosa. Esta não pode ser utilizada a $\text{pH} > 8$, pois dissolve-se, podendo no entanto ser modificada de forma a ficar resistente à hidrólise a pH mais básico.

A sílica pode ser utilizada como fase estacionária nas colunas cromatográficas por si só, mas normalmente é-lhe substituído o grupo álcool do grupo silanol por outro grupo funcional, como uma amina, para lhe conferir um carácter polar diferente, ou por uma cadeia longa de hidrocarbonetos, como o octadecil (C18) para lhe conferir um carácter apolar. Este enchimento de coluna é o mais utilizado em HPLC, e foi também, o enchimento utilizado neste trabalho.

A cromatografia em fase reversa é utilizada quando o analito se dissolve mais facilmente num solvente menos polar. Nesta técnica utiliza-se um gradiente de concentrações, começando por uma elevada concentração de um solvente mais polar, e prosseguindo até um solvente menos polar. Na cromatografia em fase normal o procedimento é o oposto. Por norma o solvente menos polar é o metanol ou acetonitrilo, sendo geralmente o solvente mais polar a água.

4.1.1.2 Colunas cromatográficas tubulares abertas

As colunas tubulares abertas são mais eficientes do que as colunas fechadas com enchimento, oferecendo um menor tempo de corrida e uma maior sensibilidade, mas possuindo no entanto uma menor capacidade de amostra do que as colunas fechadas.

As colunas tubulares abertas são colunas capilares de sílica fundida, com a fase estacionária presa nas suas paredes internas. Estas colunas são geralmente revestidas por poliimida, que é um polímero termicamente estável até temperaturas próximas de $350\text{ }^{\circ}\text{C}$. As suas dimensões são de 15 a 100 m, sendo o mais usual colunas de 30 m, com diâmetro interno de 0,10 a 0,53 mm, e normalmente com um filme de fase estacionária de $0,25\text{ }\mu\text{m}$, existindo filmes com maior espessura.

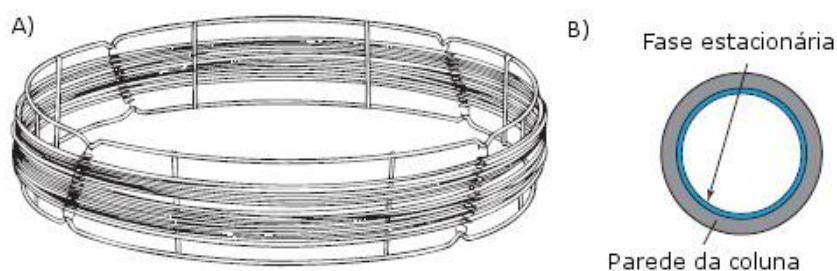


Figura 4.3: A) Coluna cromatográfica aberta para cromatografia gasosa, B) Interior da coluna cromatográfica aberta [19].

4.2 Cromatografia Líquida (LC) [19]

4.2.1 Funcionamento geral

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) consiste em forçar a passagem de um solvente com fluxo constante por uma coluna cheia de partículas microporosas de forma a obter uma elevada separação dos solutos introduzidos no sistema. O fluxo de solvente pode ser constituído apenas por um único solvente ou por uma mistura de solventes com uma composição fixa, ou ser constituído por um gradiente de concentrações, de forma a promover uma maior velocidade de eluição dos solutos, mantendo no entanto uma elevada separação cromatográfica.

Um sistema de HPLC é constituído por um amostrador automático, uma seringa de injeção, um depósito de solventes, um sistema de mistura e entrega de solvente, uma coluna cromatográfica de alta pressão, um recetor de resíduos, um equipamento de deteção (por exemplo, um espectrómetro de massa), e um sistema de controlo dos equipamentos e de recolha de resultados.

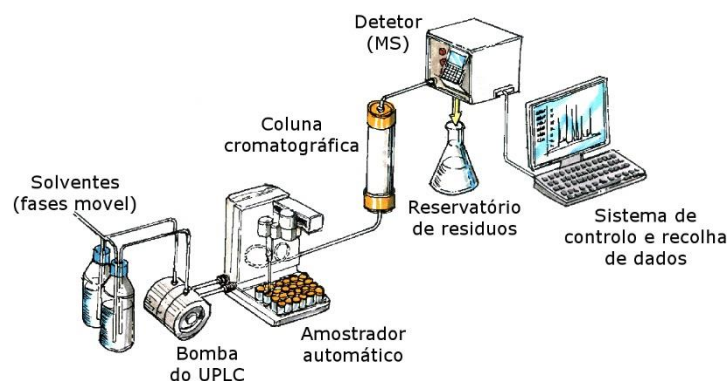


Figura 4.4: Esquema de um sistema de cromatografia líquida [20].

Um sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) é essencialmente igual ao HPLC, diferindo na utilização de colunas com enchimento de partículas com um diâmetro mais pequeno, e podendo funcionar a muito mais elevada pressão que as colunas cromatográficas de alta eficiência, o que possibilita um grande aumento da resolução dos picos cromatográficos e um tempo de corrida cromatográfica muito mais pequeno.

4.2.2 Bomba

Uma vez que a cromatografia líquida utiliza alta pressão para forçar a difusão do solvente e solutos pela coluna, a bomba é um dos principais constituintes de um sistema de HPLC, sendo ainda mais importante no UPLC, uma vez que uma das características que permitem ao UPLC uma maior resolução é a possibilidade de trabalhar a pressões ainda mais elevadas, permitindo o uso de colunas com diâmetro mais estreito e enchimento com partículas de diâmetro mais reduzido.

4.2.3 Injeção

A injeção da amostra é feita com recurso a um sistema automático constituído por um circuito para lavagem da agulha, lavagem da seringa, e medição do volume de amostra.

Por outro lado, o sistema de UPLC está permanentemente com um fluxo constante de solvente, sendo este misturado por um sistema automático de doseamento, controlado por um programa de computador, o qual é responsável pela variação do gradiente de solventes programado para a corrida cromatográfica.

4.3 Cromatografia Gasosa (GC) [19]

4.3.1 Funcionamento geral

A cromatografia gasosa baseia-se em injetar uma amostra gasosa ou líquido volátil no equipamento, sendo este vaporizado de imediato, e percorrendo a coluna cromatográfica, onde vai interagir com uma fase estacionária que reveste as suas paredes. O tempo que cada soluto demora a percorrer a coluna cromatográfica é dependente da afinidade deste para a fase estacionária, e do seu ponto de ebulição, sendo este tempo característico de cada soluto, nas mesmas condições cromatográficas.

Um sistema de GC é constituído por um sistema de injeção da amostra, coluna cromatográfica, forno com temperatura controlável, um detetor (neste caso um detetor de captura eletrónica) e um sistema de controlo dos equipamentos e de aquisição de dados.

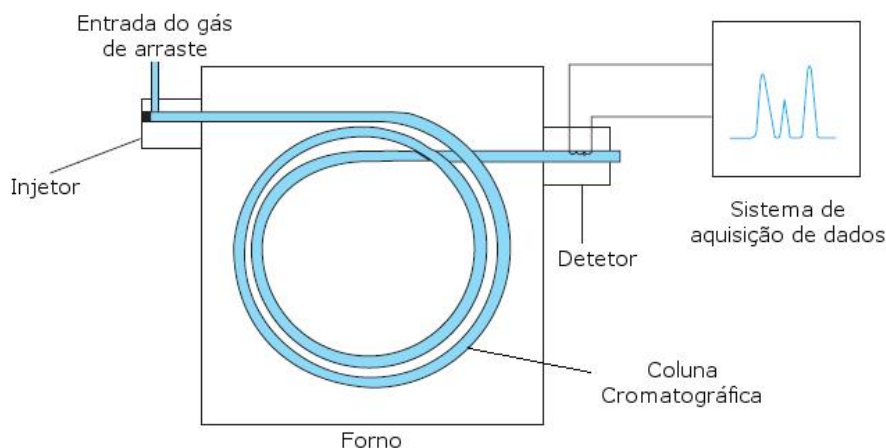


Figura 4.5: Esquema de um sistema de cromatografia gasosa^[19].

Nesta técnica recorre-se geralmente a um gradiente de temperaturas e a um gás inerte para empurrar os solutos.

O gás de arraste usado é normalmente azoto (N_2), hélio (He), ou hidrogénio (H_2). Segundo a representação das curvas de van Deemter é possível obter a mesma altura mínima de prato teórico para os três gases, sendo esta atingida a fluxos diferentes. Devido ao hidrogénio apresentar a altura mínima a um fluxo superior, este possibilita atingir a separação cromatográfica mais rapidamente, no entanto devido a este ser muito explosivo, normalmente utiliza-se hélio como gás de arraste.

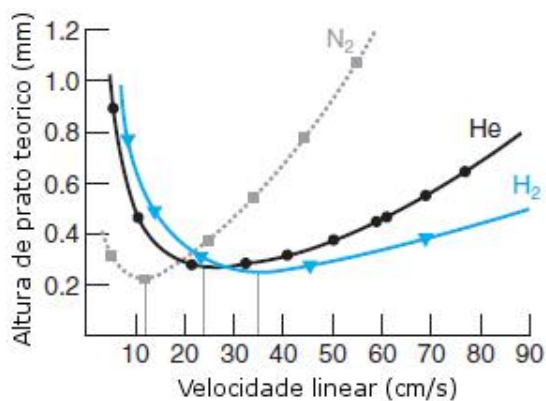


Figura 4.6: Curvas de van Deemter para cromatografia gasosa de $n-C_{17}H_{36}$ a $175\text{ }^{\circ}C$ ^[19].

O detector deve estar a uma temperatura superior à do forno, para garantir que os solutos estejam sob a forma de gás quando estes chegam ao detector.

4.3.2 Injetor

A injeção na coluna cromatográfica pode ser feita de vários modos, nomeadamente, em modo *split*, *splitless* ou *on-column*.

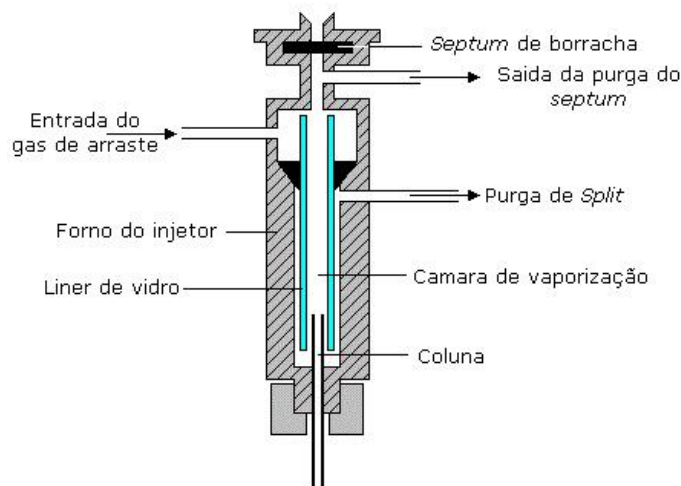


Figura 4.7: Esquema do injetor de cromatografia gasosa [21].

No modo *split* a amostra é injetada no cromatógrafo e parte da amostra é descartada através da purga de *split* antes de entrar para a coluna cromatográfica, de forma a injetar um volume menor do que o volume total da injeção.

No modo *splitless* toda a amostra é injetada no cromatógrafo. Esta pode ser feita de duas formas consoante a temperatura inicial da coluna cromatográfica, sendo estas denominadas de *solvent trapping* e *cold trapping*.

Solvent trapping consiste em utilizar uma temperatura inicial da coluna cromatográfica 40 °C abaixo da temperatura de ebulição do solvente de forma a condensar o solvente no início da coluna cromatográfica; isto origina picos mais estreitos. Para utilizar esta forma de injeção *splitless* é necessário que o solvente esteja numa proporção superior a 10^4 em relação ao analito.

Cold trapping consiste em utilizar uma temperatura inicial da coluna cromatográfica 150 °C abaixo da temperatura de ebulição do soluto de interesse de forma a fazer o solvente e outros solutos com baixo ponto de ebulição percorrer a coluna antes dos solutos de interesse. Para utilizar esta forma de injeção *splitless* é necessário que a coluna cromatográfica possua uma espessura de fase estacionária superior a 0,2 μm .

O modo de injeção *splitless* permite ainda a aplicação de um fluxo de gás de arraste constante ou a aplicação de um pulso, em que se pode duplicar a pressão do gás de arraste no momento da injeção.

A injeção *on-column* é um modo semelhante ao *splitless*, mas a injeção não é feita através de um injetor quente, mas sim diretamente na coluna cromatográfica.

Independentemente do modo de injeção, e do detetor utilizado, o volume máximo de amostra que se pode injetar é de 1-2 μl , pois este é o volume máximo que uma coluna cromatográfica consegue carregar.

O modo mais usual para quantificação vestigial é o modo de *splitless*, devido a ser o que possui melhor sensibilidade e reprodutibilidade, embora este modo apresente problemas para analitos que se decompõem a temperaturas inferiores à da sua temperatura de ebulição. No modo de injeção *split*, devido a se poder perder parte do analito volatilizado durante o passo de descarte, torna-se difícil ter elevada reprodutibilidade em análise vestigial. O modo de injeção *on-column* é um método ideal para analitos que se degradem rapidamente com a temperatura, no entanto está limitado a utilizar colunas com menor de 0,2 mm de diâmetro interno, o que limita a sua resolução.

4.3.3 Forno

Uma vez que a separação cromatográfica em GC é feita através de uma rampa de temperatura, é necessário poder controlar e variar a temperatura à qual a coluna cromatográfica se encontra, o que faz com que o forno seja uma parte muito importante do sistema de GC.

Devido a ser necessário manter a temperatura dentro do forno o mais próximo possível das temperaturas programadas para a análise cromatográfica é necessário que o forno tenha um tempo de resposta e equilíbrio muito curtos. Uma vez que é necessário voltar à temperatura inicial antes da análise seguinte, o forno também deve apresentar a capacidade de regressar à temperatura inicial num curto período de tempo.

4.4 Efeito de matriz

Numa análise cromatográfica de qualquer amostra real, existe muitas vezes a presença de interferências causadas por outros compostos presentes na matriz da amostra. O efeito de matriz pode ser definido como a diferença de resposta de um detetor para um padrão de calibração e para uma amostra real fortificada à mesma concentração. Diz-se que existe efeito de matriz quando esta diferença é superior a um valor aceite como verdadeiro devido a fatores causados pela preparação da amostra e nas variações de sensibilidade do equipamento.

Este efeito pode ser positivo (enriquecimento iónico) ou negativo (supressão iónica), consoante se verifique um aumento ou um decréscimo do sinal de resposta em relação à resposta para o padrão da mesma concentração, e é normalmente mais predominante em técnicas de cromatografia líquida do que em técnicas de cromatografia gasosa.

Para além deste efeito de matriz, também pode existir outro efeito de matriz quando se utilizam detetores universais. Este efeito é causado por interferentes que podem coeluir com os picos dos compostos alvo, ou que podem mascarar os picos dos compostos alvo pela modificação que causam na linha de base.

5 Detetores

Tanto em LC como em GC se não existir um método de detecção dos solutos, não é possível obter dados da separação cromatográfica, como tal existem diversos detetores que podem ser adaptados a ambas as técnicas, como é o caso de diversos espectrómetros de massas e existindo também detetores específicos de GC, como é o caso do detetor de captura eletrónica (ECD).

5.1 Espectrometria de Massa (MS) [22]

A espectrometria de massa baseia-se na ionização em fase gasosa das moléculas da substância a analisar, sendo os iões separados pela sua razão massa-carga (m/z).

Um equipamento de MS é constituído pela fonte de ionização, um sistema de orientação dos iões (lentes de focagem), um analisador de massas e um detetor Figura 5.1.

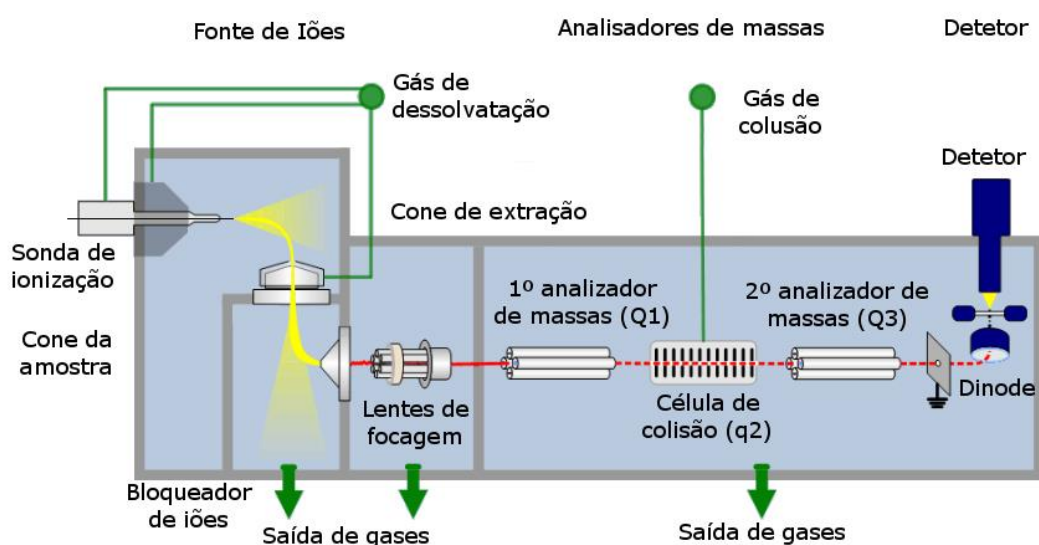


Figura 5.1: Esquema de um espectrómetro de massa de triplo quadrupolo usado em cromatografia líquida [23].

Por esta técnica se basear no deslocamento de iões ao longo de um espaço de dimensão conhecida, é necessário que não existam outras moléculas no seu caminho que com eles possam interferir. Desta forma é necessário recorrer a um vácuo elevado (superior a 1×10^{-5}) para trabalhar com um analisador de espectrometria de massa.

O ião correspondente à molécula inicial (ião molecular) sofre geralmente fragmentação, sendo que cada molécula geralmente possui uma sequência de fragmentação característica, o que possibilita a elucidação da estrutura química de

moléculas desconhecidas ou a quantificação e identificação de moléculas alvo com base em fragmentos característicos.

5.1.1 Ionização

Na técnica de *electrospray* os iões são produzidos pela introdução da amostra através da ponta de um capilar como se pode observar na Figura 5.2 (A), para a câmara de ionização, onde existe uma diferença de potencial elevada entre o capilar e o cone da amostra, criando um cone de Taylor e promovendo a formação de gotas multicarregadas. As gotas multicarregadas começam a perder volume por perda de solvente e passam pelo cone da amostra, para a câmara intermédia onde o primeiro nível de vácuo é produzido, sendo que com o acumular de cargas as gotas alongam e formam um novo cone de Taylor, Figura 5.2 (B), onde se formam novas gotas de dimensão mais reduzida e com uma carga mais elevada. Estas gotas continuam a perder volume até que a carga das gotas seja demasiado elevada e se dê a desadsorção dos iões que passam depois pelo cone de extração para as lentes de focagem e por fim para o analisador.

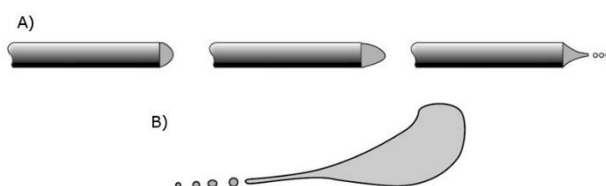


Figura 5.2: Ilustração da formação de um cone de Taylor: A) na sonda de ionização, B) a partir de uma gota por acumulação de cargas^[22].

Devido à forma de como são produzidos os iões, e ser possível aplicar uma diferença de potencial positiva ou negativa, esta técnica permite a produção de iões positivos no modo de *electrospray* positivo (ESI+) e negativos, no modo de *electrospray* negativo (ESI-), como também permite obter iões multicarregados, o que faz desta técnica uma ferramenta muito versátil para uma vasta gama de moléculas.

5.1.2 Analisador de massas

Após serem produzidos, os iões são acelerados por meio de um campo elétrico, sendo depois separados pela sua razão massa-carga no analisador.

Um exemplo de um analisador de massas é o analisador de quadrupolo, estando apresentado esquematicamente na Figura 5.3. Este é constituído por 4 barras metálicas cilíndricas e paralelas colocadas duas a duas, equidistantes de um eixo central. O funcionamento é feito pela aplicação de uma corrente contínua (dc) a uma barra e uma amplitude de voltagem de radiofrequências (rf) à outra barra com a mesma polaridade

onde os iões ressonantes com a amplitude da radiofrequências aplicada deslocam-se ao longo do analisador e os não-ressonantes colidem com as barras do quadrupolo, não chegando ao detetor. A separação de massas de acordo com a sua razão massa-carga é obtida através da variação rápida da voltagem de radiofrequências, de forma a permitir que as várias massas cheguem ao detetor.

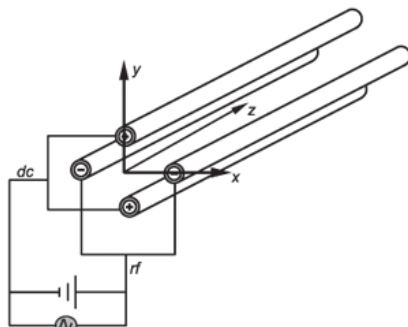


Figura 5.3: Esquema de um quadrupolo ^[24].

Os modos de operação de um analisador de massas de quadrupolo são o modo de *Full Scan* onde se obtém o espectro de massas de um composto numa gama pré-definida e o modo de *Selected Ion Recording/monitoring* (SIR ou SIM) que apenas monitoriza massas específicas, sendo assim utilizado apenas para quantificação e não dando informação necessária para a identificação de um composto. Por outro lado, é possível também utilizar mais do que um analisador de massas em sucessão, sendo este designado por espectrometria de massa *tandem*, ou MS/MS.

Os modos de funcionamento *tandem* são muito importantes em análise vestigial de compostos alvo, devido a estes poderem utilizar as duas operações do quadrupolo simples em ambos os analisadores de forma independente, permitindo atingir uma maior sensibilidade, seletividade, e reduzindo os limites de deteção e quantificação do equipamento.

5.1.3 Triplo Quadrupolo (QqQ)

O analisador de triplo quadrupolo é composto por analisadores de quadrupolo colocados em sucessão. Estes equipamentos podem ser utilizados como um simples quadrupolo ou como um triplo quadrupolo. Quando se utiliza apenas o primeiro quadrupolo este analisador permite o uso dos modos normais de funcionamento de quadrupolo simples.

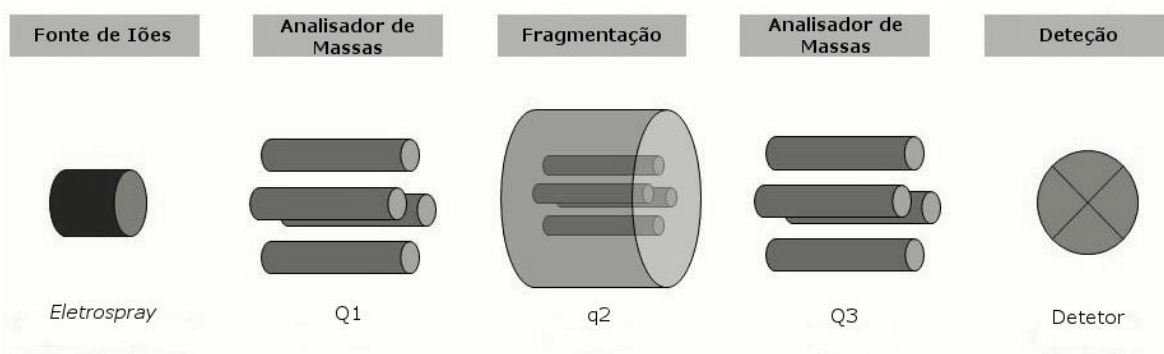


Figura 5.4: Esquema de um triplo quadrupolo^[25].

Quando operado no modo de MS/MS o equipamento utiliza o primeiro (Q1) e o terceiro (Q3) quadrupolo como analisadores e o segundo (q2) como uma célula de colisão, onde os iões que saem do Q1 sofrem dissociação por colisão (CAD) com um gás inerte, geralmente Árgon.

A célula de colisão pode ser um *Traveling Wave* (Waters T-waveTM), Figura 5.5, em vez de um quadrupolo, sendo que esta permite um aumento de sensibilidade do equipamento. Este tipo de célula de colisão é constituída por vários eléctrodos na forma de anéis colocados sucessivamente, estando suportados pelas placas de circuitos impressos que fornecem voltagem dc e rf, sendo que eléctrodos adjacentes possuem fases opostas da voltagem rf, o que força os iões a ficarem no espaço de transmissão de iões, mas permitindo a livre passagem dos mesmos^[26].

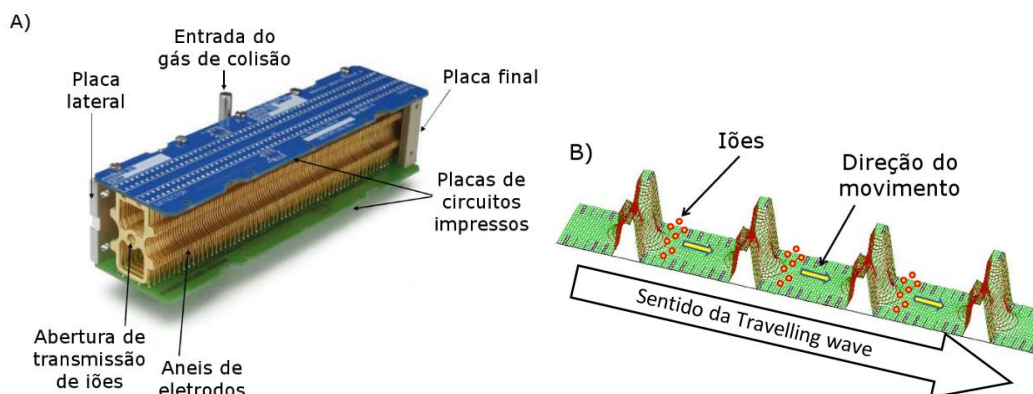


Figura 5.5: A) Waters T-waveTM, B) Esquema da forma da deslocação dos iões^[26].

Os vários modos de operação do MS/MS encontram-se representados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1: Modos de operação de um triplo quadrupolo.

	Modo de funcionamento		
	Q1	q2	Q3
Scan do Ião Produto (Daughter Scan)	SIM	CAD	Full Scan
Scan do Ião Precursor (Parent Ion Scan)	Full Scan	CAD	SIM
Multiple Reaction Monitoring (MRM)	SIM	CAD	SIM
Constant Neutral Loss Scan	Full Scan	CAD	Full Scan

O modo de *scan* de ião produto utiliza o Q1 como um filtro de massas, permitindo apenas passar a razão m/z pretendida, estando o Q3 a operar no modo de *full scan*, obtendo o espectro de massas do ião pretendido. Este modo é fundamental para o desenvolvimento e otimização das condições de operação para o modo de MRM (*Multiple Reaction Monitoring*).

O modo de MRM é muito semelhante ao modo SIM, também não produzindo um espectro de massas do composto, sendo neste caso monitorizada uma transição ião precursor-ião produto característica. Neste modo os dois analisadores são utilizados no modo de SIM, onde o primeiro apenas deixa passar o ião precursor de m/z pretendida para o segundo quadrupolo, onde sofre dissociação por colisão com o gás de colisão, e o segundo analisador por sua vez apenas deixa os iões fragmento pretendidos chegar ao detetor.

Quando se utiliza o modo MRM em quantificação geralmente definem-se as condições para duas transições MRM, sendo geralmente a mais intensa para quantificação (MRM1) e a segunda mais intensa para confirmação do composto (MRM2).

5.2 Detecção por Captura Eletrónica (ECD) [19]

Este tipo de detetor é apenas usado em cromatografia gasosa.

O analisador de captura eletrónica baseia-se na alteração de uma corrente elétrica constante causada por espécies eletronegativas e como tal só é aplicável a compostos que possuam átomos muito eletronegativos.

O ECD cria uma pequena corrente elétrica com os iões produzidos pela ionização do gás de arraste por partículas beta de uma fonte radioativa (^{63}Ni), sendo esta mantida constante com o uso de pulsos de frequência de voltagem. A variação da frequência necessária para manter esta corrente constante é a resposta do equipamento.

O gás de arraste pode ser N_2 , H_2 ou He , sendo o mais utilizado He por proporcionar uma melhor eficiência na separação de GC que o N_2 e por ser mais seguro que o H_2 . Devido ao fluxo da corrente de arraste vinda do componente de GC ser baixa, é necessário utilizar um outro gás adicional (gás auxiliar), podendo este ser N_2 ou uma mistura de argon com 5 % de metano.

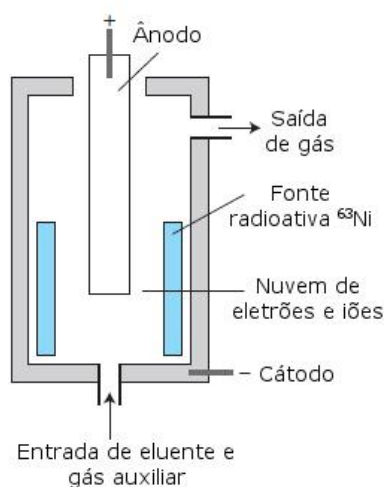


Figura 5.6: Esquema de um detetor de captura eletrónica [19].

Estes detetores são extremamente sensíveis, sendo que o seu limite de deteção é normalmente considerado ser próximo do limite de deteção dos espectrómetros de massa quando utilizados no modo de SIM.

6 Validação [27]

6.1 Introdução

Sempre que se realiza um método de ensaio analítico este está sujeito a diversas fontes de incerteza aleatória ou sistemática. Esta incerteza pode fazer com que os resultados obtidos difiram largamente do valor real. Assim é necessário um processo para validar o método, de forma a conferir credibilidade aos resultados obtidos, sendo este processo de validação tão exigente quanto a qualidade e credibilidade requerida pelo laboratório.

A validação deve ser feita sempre que se elabore um método novo estando ou não descrito na literatura não normativa, ou quando se executam modificações significativas no procedimento ou nos métodos de normas ou documentos normativos.

Os requisitos para a validação de um método interno são, a descrição detalhada do método de ensaio, uma avaliação do grau de exigência necessário, e parâmetros a analisar. Os parâmetros mínimos a analisar são:

- Gama de trabalho/Linearidade;
- Limiares analíticos (Limite de Detecção e Quantificação);
- Sensibilidade;
- Precisão;
- Exatidão.

Para avaliação destes parâmetros pode-se recorrer a um método indireto ou a um método direto.

6.2 Seletividade e Especificidade

Para a validação de um método é necessário avaliar e garantir a seletividade deste para o analito que se quer analisar, ou seja, é necessário garantir que o método consegue distinguir os analitos uns dos outros e dos interferentes presentes na matriz.

A especificidade é a capacidade do método quantificar o analito na presença de interferentes, com a garantia de que a grandeza medida provem apenas do analito. Para isto é necessário proceder a ensaios para averiguar o efeito dos interferentes presentes na matriz.

Para averiguar o efeito de matriz normalmente recorre-se a ensaios de recuperação feitos utilizando a matriz em estudo, onde se fortifica a amostra com uma quantidade conhecida de analito e se submete esta ao método de análise a validar. Para que o método possa ser validado, é necessário que o resultado dos testes de recuperação esteja entre 70 % a 120 %, podendo ser aceitável trabalhar com recuperações de 50 % se for necessário recorrer a uma técnica de extração do analito. Isto desde que o coeficiente de variação para os ensaios de recuperação realizados seja inferior a 15 %, e exista um mínimo de 6 a 10 recuperações individuais.

Para os métodos que recorrem à espectrometria de massa *tandem*, existe outro requisito para validar a especificidade. Este requisito é a razão de confirmação (RC), sendo esta a razão entre as áreas obtidas para as transições MRM1 e MRM2, onde esta relação deve ser o mais próxima possível de 1, devendo a transição MRM1 ser a de maior intensidade.

$$RC = \frac{A^{MRM1}}{A^{MRM2}} \quad \text{Equação 6.1}$$

Onde:

RC – razão de confirmação para um determinado composto

A^{MRM1} – Área da transição de Quantificação (MRM1)

A^{MRM2} – Área da transição de Confirmação (MRM2)

6.2.1 Confirmação de positivos

Tão importante como uma boa quantificação é a capacidade de confirmar que o analito quantificado é de fato o analito alvo e não outro composto (falso positivo). Também a confirmação de que não se está perante um falso negativo, ou seja de que se verifica a ausência de composto quando este está presente na amostra é de importância crucial. Assim é de extrema importância existir uma forma de identificação do composto com um elevado grau de confiança.

Geralmente quando se recorre a técnicas cromatográficas como GC ou LC, a primeira fonte de informação é o tempo de retenção ao qual o pico cromatográfico é detetado. De uma forma geral admite-se uma variação máxima de 0,5 % para o tempo de retenção médio de um composto ao longo da curva de calibração, sendo que o tempo de retenção do pico na amostra deve estar a $\pm 0,1$ minutos da média destes em cromatografia líquida e $\pm 0,05$ minutos em cromatografia gasosa.

Para a confirmação de que o pico identificado corresponde de fato ao composto em análise, deve existir uma segunda fonte de informação utilizada para confirmação. Esta segunda fonte de informação quando se utiliza técnicas de espectrometria de massa *tandem* geralmente é uma segunda transição característica para o composto, no entanto pode-se utilizar outras técnicas cromatográficas distintas para a identificação do composto. Quando se utiliza um detetor seletivo, como o ECD, que não fornece mais informação qualitativa do que o tempo de retenção, é necessário recorrer a outra técnica cromatográfica distinta ou a uma coluna cromatográfica com polaridade diferente, de forma a obter informação que permita a identificação do composto.

6.3 Quantificação

Sempre que se desenvolve um método quantitativo é necessário uma forma de transformar o sinal de resposta do equipamento em uma quantidade química, para o que normalmente se recorre ao traçado de curvas de calibração, e à averiguação dos limiares analíticos e da sensibilidade.

6.3.1 Curva de calibração

Geralmente para a calibração do equipamento procede-se à análise de uma série de padrões de concentração rigorosamente conhecida. Isto deve ser sempre realizado antes da análise de amostras, e sendo analisados padrões de controlo independentes para garantir que a curva de calibração continua válida. A curva de calibração pode ser considerada válida por mais tempo se se criar um histórico de análises com padrões de controlo analisados em dias sucessivos, que cumpra os critérios de aceitação definidos internamente.

Para o traçado de uma curva de calibração é necessário um mínimo de 5 pontos de calibração, sendo o aconselhável 10, devendo estes estarem distribuídos em intervalos iguais ao longo da gama de trabalho.

Para o tratamento matemático dos resultados obtidos recorre-se a regressões lineares utilizando o método dos mínimos quadrados (ISO 8466-1). A resposta do equipamento é representada no eixo dos yy, assumindo-se que o erro associado à concentração é desprezável quando comparado com o erro do equipamento.

A avaliação da linearidade da curva de calibração obtida com estes pontos experimentais pode ser feita através do cálculo do coeficiente de correlação r , e do afastamento dos pontos experimentais em relação à curva ajustada (teste da análise de resíduos).

O coeficiente de correlação, de ser o mais próximo de 1, tendo-se normalmente um critério de aceitação para a curva de calibração em que o valor mínimo aceite para o coeficiente de correlação linear é de 0,995.

Os resíduos têm como intervalo de aceitação $\pm 15\%$ para os padrões ao longo da curva de calibração, sendo aceite uma variabilidade de $\pm 20\%$ para o primeiro padrão da gama de trabalho.

Quando se utiliza o método dos mínimos quadrados para o processamento da regressão linear é necessário que exista uma distribuição normal e homogeneidade de variâncias ao longo da gama de concentração.

Outras formas complementares de avaliar a linearidade é o teste de Mandel, para o qual se aceita uma curva como sendo linear, se o Valor Teste (VT) for menor que o

valor tabelado da distribuição de F de Fisher/Snedecor para o número de graus de liberdade envolvidos e para um grau de confiança de 95 %. Outro método que se pode aplicar para o estudo da linearidade é o método das áreas normalizadas para o qual normalmente se aceitam desvios de $\pm 15\%$. O teste de Rikilt também pode ser usado para confirmação da linearidade, para o qual normalmente se aceitam desvios de $\pm 10\%$.

6.3.1.1 *Gama de trabalho*

É a gama de concentrações que se pretende validar para o método de quantificação e está delimitada pelo padrão de concentração inferior e superior da curva de calibração.

6.3.1.2 *Gama de linearidade*

É a gama de concentrações para a qual se consegue cumprir os requisitos de linearidade mínimos, sendo estes validados pelo coeficiente de correlação, existência de distribuição normal de resíduos e o teste de Mandel referidos em 6.3.1.

6.3.2 *Limiões analíticos*

Os limiões analíticos são de elevada importância em análise vestigial, pois estes dão informação de qual é a quantidade mínima de um analito que é possível identificar (LOD) e quantificar (LOQ) com um elevado grau de confiança.

Para averiguar estes limiões analíticos pode-se recorrer à razão sinal/ruído, à análise de brancos ou do padrão correspondente ao limite inferior da gama de trabalho em condições de repetibilidade ou de precisão intermédia, ou desvio padrão residual da curva de calibração.

6.3.2.1 *Limite de Detecção (LOD)*

É a quantidade mais pequena de analito que se consegue distinguir do branco de matriz com um elevado grau de confiança, mesmo não sendo possível quantificar com um elevado grau de confiança. Podendo ser averiguada das seguintes formas:

- Razão sinal/ruído do padrão de menor concentração:

$$LOD = 3 \times \frac{Sinal}{Ruido} \qquad \text{Equação 6.2}$$

- Análises repetidas de um padrão correspondente ao limite inferior da gama de trabalho ou através da análise de brancos em condições de repetibilidade ou precisão intermédia:

$$LOD = 3 \times S_r \quad \text{Equação 6.3}$$

Sendo S_r o desvio padrão das concentrações obtidas.

- Desvio padrão residual da curva de calibração linear $S_{y/x}$

$$LOD = \frac{3,3 \times S_{y/x}}{b} \quad \text{Equação 6.4}$$

Sendo b o declive da curva de calibração.

6.3.2.2 Limite de Quantificação (LOQ)

O limite de quantificação é o valor ao qual se consegue quantificar um analito com um elevado grau de confiança. Na prática isto corresponde à concentração do padrão de menor concentração da curva de calibração, devendo este ser averiguado para garantir a sua qualidade. O limite de quantificação pode ser determinado por:

- Razão sinal/ruído do padrão correspondente ao limite inferior da curva de calibração:

$$LOQ = 10 \times \text{Sinal} / \text{Ruido} \quad \text{Equação 6.5}$$

- Análises repetidas de um padrão correspondente ao limite inferior da gama de trabalho ou através da análise de brancos em condições de repetibilidade ou precisão intermédia:

$$LOQ = 10 \times S_r \quad \text{Equação 6.6}$$

Sendo S_r o desvio padrão das concentrações.

- Desvio padrão residual da curva de calibração linear $S_{y/x}$

$$LOQ = \frac{10 \times S_{y/x}}{b} \quad \text{Equação 6.7}$$

Sendo b o declive da curva de calibração.

Este valor de *LOQ* tem de ser necessariamente igual ou inferior à concentração do padrão correspondente ao limite inferior da gama de trabalho, pois não é possível quantificar com elevado grau de confiança abaixo deste valor, devendo a gama de trabalho ser redefinida caso isto não se verifique.

6.4 Sensibilidade

A sensibilidade pode ser definida como o aumento de sinal de resposta do equipamento para um certo aumento da concentração do analito. Podendo ser definida pela Equação 6.8. Este parâmetro avalia a capacidade do equipamento distinguir pequenas variações na concentração do analito, sendo idealmente um valor constante para uma curva de calibração linear, e igual ao declive da mesma.

$$Sensib. = \frac{\Delta L}{\Delta C} \quad \text{Equação 6.8}$$

Onde ΔL é a variação do sinal de resposta (área) e ΔC é a variação da concentração que originou a variação do sinal de resposta.

Este parâmetro é especialmente importante quando se pretende comparar a resposta de diferentes analitos analisados da mesma forma ou comparar métodos de análise para o mesmo analito.

6.5 Precisão

A precisão é o termo geral que pretende avaliar a dispersão de resultados obtidos de análises independentes e repetidas para uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões sob as mesmas condições analíticas. São preferíveis resultados obtidos a partir de matrizes em vez de padrões.

Para a averiguação da precisão do método existem duas medidas extremas possíveis, a Repetibilidade e a Reprodutibilidade, existindo uma medida intermédia, à qual se dá o nome de Precisão intermédia.

6.5.1 Repetibilidade

A repetibilidade mede a variabilidade dos resultados obtidos para uma matriz fortificada ou para soluções padrão, quando este é analisado sucessivamente em condições o mais idênticas possível, isto é, mesmo laboratório, equipamento, analista, concentração, e num curto espaço de tempo.

Para avaliar a repetibilidade é necessário um número de análises igual ou superior a 10. Devido à repetibilidade variar com a concentração é necessário avaliar esta para várias concentrações, sendo também removidos os valores aberrantes (ISO 5725-2). A repetibilidade pode ser depois avaliada através do cálculo do coeficiente de variação para cada concentração em cada matriz.

Considera-se que existe repetibilidade aceitável, se o valor para o coeficiente de variação for inferior a 15 %. Sendo que para técnicas que recorram ao método de MRM, esta deve ser executada com os resultados da transição de quantificação. Pode ainda ser avaliada a variabilidade dos resultados obtidos com a transição de qualificação e com a razão de confirmação.

6.5.2 Reprodutibilidade

Esta é a medida da precisão que visa avaliar a precisão do método quando executado em condições diferentes, podendo ser obtida por variações das condições (operador ou equipamento) dentro do próprio laboratório ou através de ensaios interlaboratoriais. Nestes ensaios uma entidade organizadora envia para os laboratórios participantes uma amostra, sendo que cada laboratório analisa e posteriormente reporta o resultado da análise para esta.

Sendo a reprodutibilidade calculada com a variância dos resultados considerados do ensaio interlaboratorial.

6.5.3 Precisão intermédia

A precisão intermédia mede a variabilidade de resultados quando se aplica o mesmo método a amostras iguais ou semelhantes ou soluções padrão, no mesmo laboratório mas definindo exatamente as condições a alterar, sejam estas o equipamento, o analista, a época ou a existência/inexistência de calibração.

Este método, por ser o que mais se aproxima do modo de funcionamento normal de um laboratório é o mais recomendado.

6.5.4 Robustez

A robustez de um método mede a capacidade de este não ser influenciado por pequenas alterações que possam acontecer durante a execução do seu método experimental.

Para a avaliação da robustez de um método pode recorrer-se ao teste de YOUNDEN que visa quantificar o efeito de possíveis variáveis, ou proceder a ensaios de precisão intermédia em vários dias, variando algumas das condições de operação do laboratório verificando-se no final se as variáveis provocam um impacto significativo nos resultados, sendo que este não dá informação relativa à influência de cada variável individualmente.

6.6 Exatidão

A exatidão é a medida que visa avaliar a concordância dos valores produzidos por um método quando comparados com um valor de referência aceite convencionalmente como verdadeiro.

Alguns métodos para determinar a exatidão são:

- Materiais de referência certificados;
- Ensaio Interlaboratoriais;
- Testes Comparativos;
- Ensaio de recuperação.

Uma forma geral e simples de avaliar a exatidão do método analítico é pelo cálculo do erro relativo dos ensaios realizados. Este cálculo pode ser executado de acordo com a equação seguinte:

$$\text{Erro relativo (\%)} = \frac{X_{lab} - X_v}{X_v} \times 100 \quad \text{Equação 6.9}$$

Onde X_{lab} é a recuperação média das injeções executadas, sob a forma de concentração e X_v é a concentração considerada como verdadeira. Este valor de referência pode ser obtido pelo certificado do material de referência; pode ser divulgada pela entidade organizadora no final de um ensaio interlaboratorial; pode ser a recuperação obtida pelo método de referência; ou a recuperação alvo de um ensaio de recuperação.

6.6.1 Ensaios interlaboratoriais

Em ensaios interlaboratoriais uma entidade organizadora distribui uma amostra pelos vários laboratórios participantes, que a analisam como se fosse uma amostra real e reportam o resultado que obtiveram.

A entidade organizadora possui o valor de referência para as amostras distribuídas e com base neste valor, e no valor obtido pelos laboratórios calcula o fator de desempenho *Z-score*, sendo este uma escala de concordância entre o resultado obtido pelo laboratório e o resultado assumido como verdadeiro pela entidade organizadora.

6.6.2 Ensaios de recuperação

A utilização de ensaios de recuperação é normalmente o método mais utilizado para avaliar a exatidão de um método interno do laboratório, devido a muitas vezes não existirem padrões de referência certificados e não existirem ensaios interlaboratoriais que contenham os compostos a validar.

Nestes ensaios adiciona-se uma quantidade conhecida do analito (fortificação) à amostra da matriz para a qual se pretende validar o método, submetendo esta e a amostra sem ser fortificada a todo o processo analítico que se pretende validar.

O resultado do ensaio de recuperação é a razão entre a concentração obtida pela quantificação analítica e a quantidade teórica do analito na amostra, sendo subtraído o valor da concentração obtida para a amostra não fortificada à concentração obtida para a amostra fortificada.

Devido à recuperação poder variar com a concentração de analito, é recomendado que se proceda a este ensaio para pelo menos uma concentração próxima de ambos os extremos da gama de trabalho, e para um valor intermédio, sendo necessário um mínimo de 6 ensaios para cada concentração.

A forma de avaliação deste parâmetro é pelo cálculo do coeficiente de variação do ensaio de recuperação, podendo este ser calculado para cada matriz individualmente ou para o método global, recorrendo as diversas matrizes estudadas.

6.7 Incerteza global do método [28] [29]

A incerteza global do método é a medida resultante da combinação de todas as fontes de incerteza a que o método está sujeito, sendo estes erros aleatórios e sistemáticos.

Erros sistemáticos são geralmente erros associados aos equipamentos ou operador, sendo erros que permanecem com boa repetibilidade entre ensaios diferentes, sendo traduzidos como um desvio de tendência fixa, quando comparado com o valor tido como verdadeiro para a amostra analisada (amostra certificada). Na existência destes erros geralmente é possível identificar a causa e corrigi-la.

Erros aleatórios são erros que não apresentam nenhuma tendência fixa, nem repetibilidade e de uma forma geral não é possível identificar a sua causa. Devido a não se conseguir identificar a causa, quando este tipo de erros possui uma influência muito grande no método analítico, este deve ser modificado de forma a reduzir a contribuição destes erros aleatórios para um valor aceitável.

A quantificação da incerteza global do método pode ser feita pelo cálculo da incerteza de cada passo do método e sendo calculada a incerteza global pela combinação das incertezas dos vários passos do método ou pelo cálculo direto com base nos dados de controlo de qualidade e ensaios de recuperação ou de ensaios interlaboratoriais.

A incerteza global de um método é geralmente apresentada como uma incerteza expandida, ou seja, a incerteza combinada multiplicada por um fator de confiança. Este fator de confiança geralmente é de 2, o que confere um grau de confiança de 95 %, ou 3, para um grau de confiança de 99,7 %.

7 Técnica de preparação de amostras

Ao efetuar uma análise vestigial é necessário preparar a amostra de forma a esta ser compatível com a técnica analítica que se pretende utilizar, ou para permitir atingir o limite de quantificação exigido pela legislação. Assim a técnica de preparação de amostras é normalmente um processo de extração e concentração do analito pretendido.

No entanto por vezes estas técnicas de extração causam problemas de efeito de matriz durante a separação cromatográfica ou deteção, levando à necessidade de recorrer a métodos alternativos como a preparação de curvas de calibração em matriz utilizando o extrato do método de extração.

Para além das técnicas de extração é possível recorrer a métodos de injeção direta, devido ao avanço dos equipamentos analíticos que permitem chegar a limites de quantificação muito baixos para alguns analitos.

7.1 Método de injeção direta

O método de injeção direta consiste na introdução direta da amostra no equipamento, sem que exista um processo prévio de extração. Isto limita a sua aplicação a sistemas LC, pois não se pode analisar amostras de água diretamente por GC.

O único tratamento a que se deve submeter a amostra é a filtração, para que não haja obstrução da coluna cromatográfica. Também neste método pode ser necessário recorrer à diluição da amostra por esta ser muito concentrada ou para minimizar o efeito de matriz.

7.2 Técnicas de extração e concentração de amostras

Existem várias técnicas de extração para a preparação de amostras em análise cromatográfica, sendo as mais usuais a extração líquido-líquido (LLE) e a extração em fase sólida (SPE). Estas técnicas são utilizadas quer para substituir o solvente por um solvente mais apropriado para a técnica cromatográfica que se pretende utilizar, quer para concentrar a amostra, de forma a conseguir atingir os limites de quantificação compatíveis com os baixos níveis de concentração dos poluentes nas amostras a analisar.

7.2.1 Extração Líquido-Líquido (LLE) [19]

A extração líquido-líquido é uma técnica que se baseia no equilíbrio dinâmico de um analito entre duas fases de líquidos imiscíveis, levando a serem transferidos de uma fase para a outra, devido à sua diferente solubilidade nas duas fases líquidas.

A razão entre a atividade do soluto presente em cada fase $\left(\frac{a_s^2}{a_s^1}\right)$ no equilíbrio, é denominada de coeficiente de partição, K . A atividade do soluto s na fase i é dado por:

$$a_s^i = [s]_i \times \gamma_s^i \quad \text{Equação 7.1}$$

Onde $[s]_i$ é a concentração do soluto na fase i e γ_s^i é o coeficiente de atividade nessa fase. Para soluções muito diluídas e meios com força iônica baixo, pode-se considerar que o coeficiente de atividade do soluto se aproxima da unidade, pelo que o coeficiente de partição pode ser expresso do seguinte modo:

$$k = \frac{[s]_2}{[s]_1} \quad \text{Equação 7.2}$$

Com base neste e no volume de ambas as fases é possível calcular a eficiência da extração pela Equação 7.3, onde q é a fração de analito presente na fase 1 após a extração, V_1 é o volume da fase 1 e V_2 é o volume da fase 2.

$$q = \frac{V_1}{V_1 + kV_2} \quad \text{Equação 7.3}$$

Esta equação 7.3 mostra que quanto maior for o coeficiente de partição menor é a fração de soluto que permanece na fase 1 (aquosa). Se se executar várias extrações sucessivas do analito com solvente fresco, a eficiência da extração é dada por q^n , sendo n o número de extrações sucessivas. Isto mostra que é possível aumentar a eficiência do processo de extração recorrendo-se a várias extrações utilizando um volume pequeno de solvente em cada passo, em vez de uma extração única com o mesmo volume de solvente. No entanto, como é natural, isto implica um maior tempo de preparação da amostra.

Devido ao coeficiente de atividade variar com o pH para espécies ionizáveis, na extração líquido-líquido pode-se variar o pH das fases de forma a deslocar o ponto de equilíbrio da concentração do analito a extrair, e desta forma aumentar a eficiência do método de LLE.

Uma vez que este método apenas se baseia no equilíbrio dos solutos em duas fases, e este ser regido pelo coeficiente de atividade de cada soluto, faz com que este método não seja muito seletivo, uma vez que todos os interferentes com o coeficiente de partição superior a 1 são extraídos da fase aquosa para a fase orgânica.

Para poder ser utilizado nesta técnica um solvente tem de possuir as seguintes características:

- Possuir elevada seletividade e especificidade;
- Ser pouco miscível com a amostra a analisar e possuir uma diferença significativa de densidade relativamente a ela;
- Não pode reagir quimicamente com o analito nem amostra;
- Deve ser compatível com a técnica cromatográfica que se pretende utilizar;
- Deve possuir um ponto de ebulição mais baixo que o do analito, no caso de ser necessário proceder a um passo adicional de concentração do extrato por evaporação de solvente, ou uma troca de solvente por evaporação.

7.2.1.1 *Funcionamento*

O procedimento consiste em colocar o solvente para extração juntamente com a amostra numa ampola de decantação, agitar a mistura, deixar repousar e remover a fase inferior.

A necessidade de agitação neste método deve-se a que a transferência de massa dos solutos entre as fases se dá na superfície de contacto entre as fases, sendo que um processo de agitação origina o aumento da interface entre os dois líquidos, promovendo uma transferência de massa entre os líquidos mais rápida.

A necessidade dos líquidos serem muito pouco miscíveis deve-se à necessidade de obter uma separação de fases completa num curto espaço de tempo, sendo que esta separação de fases muitas vezes não é completa devido à formação de emulsões.

A Figura 7.1 ilustra a forma da distribuição do analito antes da extração e depois de 1 e 2 extrações com solvente fresco em cada extração.

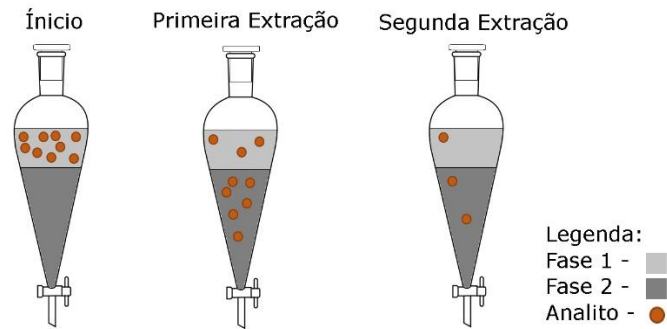


Figura 7.1: Ilustração de duas extrações líquido-líquido executadas sobre a mesma amostra sucessivamente.

7.2.2 Extração em Fase Sólida (SPE) [30] [31]

7.2.2.1 Princípios gerais

Na técnica de extração em fase sólida, aplicam-se os mesmos princípios que caracterizam a extração líquido-líquido, com a diferença de que em SPE uma das fases é uma fase estacionária sólida, que se encontra no interior de um cartucho de SPE.

Nesta técnica a amostra é passada pelo cartucho de SPE, sendo o analito retido pelo material poroso que constitui a fase estacionária, e posteriormente eluído com um solvente apropriado.

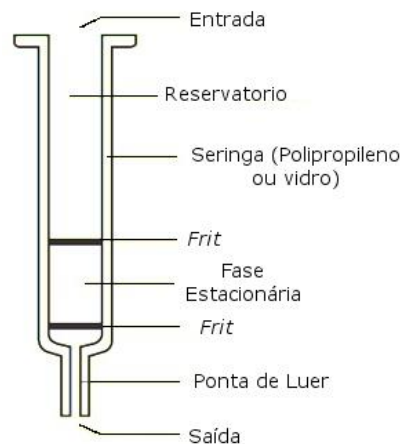


Figura 7.2: Esquema de um cartucho de extração em fase sólida [30].

7.2.2.2 Cartuchos de SPE e o seu enchimento

O responsável pela grande eficiência e especificidade desta técnica é o tipo de enchimento utilizado nos cartuchos de SPE. Este enchimento pode ser de várias origens, podendo ser de sílica, sílica modificada ou polimérica, enquanto os cartuchos são geralmente um material com boa resistência aos solventes orgânicos utilizados, como polipropileno ou vidro.

O enchimento dos cartuchos de SPE é normalmente constituído por partículas de 10, 40 ou 100 μm e dimensão de poro de 60, 120 ou 300 \AA . Devido às partículas serem de grande dimensão é possível aplicar fluxos rápidos mantendo uma pressão com pouca variação. Por outro lado, a elevada dimensão das partículas faz com que a eficiência de separação dos cartuchos de SPE seja baixa, no entanto isto não é muito relevante devido ao tipo de separação pretendida para um cartucho de SPE.

Os enchimentos à base de sílica são muito utilizados devido a estes serem materiais de baixo custo, de fácil preparação, com uma elevada repetibilidade para o tipo de sílica produzida, e por praticamente não serem afetados pelos vários solventes orgânicos utilizados ou pelas amostras.

A sílica não modificada é muito polar devido aos grupos silanol, no entanto é possível modificar os grupos silanol de forma a obter sílicas com polaridades diferentes possibilitando a retenção de outros compostos que normalmente não seriam retidos. Um exemplo destas sílicas modificadas é o caso da sílica substituída com cadeias C18 de forma a criar uma fase estacionária mais apolar, sendo que estas ainda possuem grupos silanol residuais. Estes por sua vez podem ser submetidas a uma reação de metilação para eliminar estes grupos silanol residuais, sendo estas sílicas sem grupos silanol livres geralmente denominadas por “*endcap*” ou pela sigla EC.

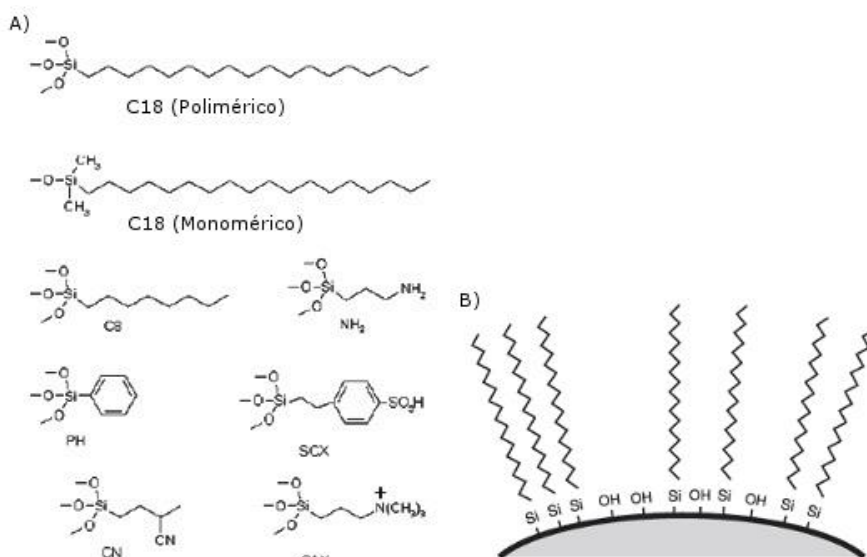


Figura 7.3: A) Exemplo de possíveis grupos substituintes da sílica, B) sílica substituída com octadecil (C18)^[30].

Para além destas sílicas existem polímeros com estrutura cruzada de poliestireno divinilbenzeno (PSDVB). Este polímero constituído por ligações cruzadas, possui uma área superficial e tamanho de poro razoáveis, e são mais estável a pH mais básico que os materiais de sílica.

7.2.2.3 *Efeito de matriz e Breakthrough*

À semelhança da cromatografia líquida, esta técnica também é afetada pela matriz da amostra, sendo no entanto o efeito diferente.

Devido aos cartuchos de SPE reterem todas as substâncias que têm afinidade para a sua fase estacionária, isto significa que outras substâncias para além dos analitos podem ficar retidas no cartucho, o que influencia a sua eficiência na retenção dos analitos. Para além disto, estes interferentes podem ser eluídos juntamente com os analitos de interesse, podendo causar interferências no método cromatográfico quando se utilizam detetores universais ou pouco seletivos.

O efeito de *breakthrough* é definido como a quantidade máxima de analito e interferentes que o cartucho consegue reter, sendo que se se ultrapassar este limite o analito não será retido pela fase estacionária do cartucho.

Este efeito é geralmente avaliado em termos de volume, sendo chamado de volume de *breakthrough* ao volume mínimo que origina este efeito, e sendo por isso o volume limite do cartucho de SPE. Este volume situa-se normalmente estar entre 1 – 1,8 l, sendo possível utilizar volumes superiores, o que no entanto depende muito da quantidade de interferentes presentes na amostra.

7.2.2.4 *Etapas do processo de SPE*

O processo de SPE consiste essencialmente em 4 etapas: a ativação ou condicionamento do cartucho de SPE, a passagem da amostra, a lavagem do cartucho de SPE e por ultimo a eluição do extrato.

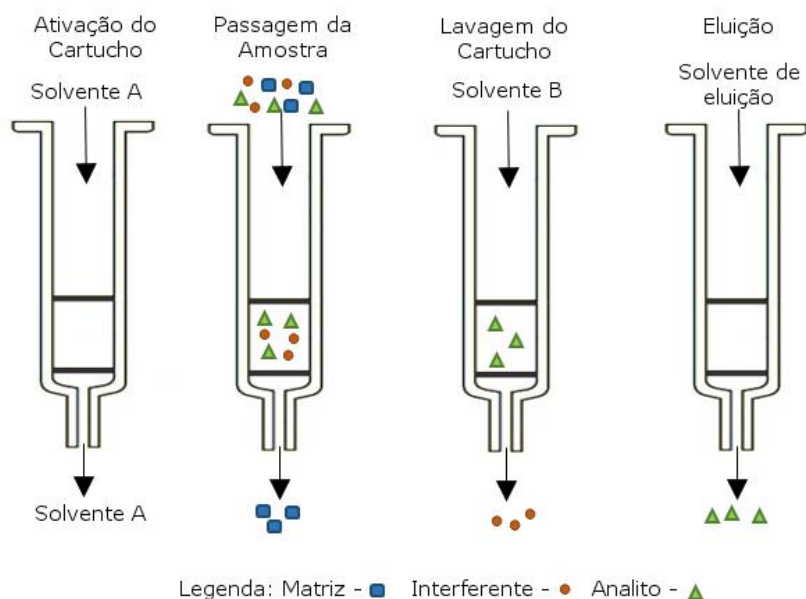


Figura 7.4: Esquema de uma extração em fase sólida.

1 – Condicionamento ou ativação

O condicionamento ou ativação do cartucho de SPE consiste em passar um pequeno volume de solvente para remover ar que possa estar dentro do cartucho e ativar os centros ativos da fase estacionária, seguindo-se de um passo de estabilização onde se passa um solvente com composição semelhante à da amostra. Normalmente utiliza-se metanol para o condicionamento de cartuchos de fase reversa.

2 – Passagem da amostra

A passagem da amostra é constituída por duas etapas, a primeira é o pré-tratamento da amostra caso este exista, sendo o segundo a passagem da amostra pelo cartucho de SPE.

3 – Lavagem do cartucho de SPE

A lavagem do cartucho de SPE serve para remover impurezas presentes na amostra que ficaram retidas, mas que possuem menor afinidade para a fase estacionária que o analito, ou para remover restos de matriz ou analito que não tenham ficado retidos no cartucho de SPE.

Para este passo geralmente recorre-se a um pequeno volume de um solvente ou mistura de solventes com polaridade intermédia entre a amostra e o solvente de eluição, sendo normal recorrer a uma mistura aquosa de metanol ou acetonitrilo quando se utiliza cartuchos de fase reversa.

Dependendo do solvente de eluição ou da técnica que se pretende utilizar para analisar o extrato pode ser necessário um passo de secagem, caso se utilize água ultrapura para a lavagem.

4 – Eluição dos analitos

Este passo consiste em eluir os analitos de forma a obter o extrato de SPE. Para a eluição deve utilizar-se um solvente adequado à técnica cromatográfica com que se pretende analisar o extrato, sendo que o solvente deve possuir uma grande força de eluição para os analitos pretendidos. Isto é, no caso de se utilizar um cartucho de fase reversa deve-se utilizar um solvente muito polar. Uma vez que solventes puros nem sempre possuem força de eluição suficiente para a eluição dos analitos, muitas vezes recorre-se a misturas de solventes para este fim.

7.2.3 Concentração e troca de solvente

Em ambas as técnicas de extração muitas vezes o extrato não fica suficientemente concentrado para atingir os limites de quantificação pretendidos. Assim é necessário recorrer a um passo de concentração do extrato por evaporação de solvente, geralmente atingindo-se um volume final de 0,5 – 1 ml. Também neste passo é possível executar uma troca de solvente, substituindo-o por um menos volátil.

7.3 Vantagens e desvantagens das várias técnicas de preparação de amostras

A técnica de injeção direta tem as grandes vantagens de não necessitar de solventes orgânicos, e ser muito simples de executar, no entanto a sua utilização depende muito do limite de quantificação possível de atingir para o composto, e do limite imposto pela legislação, o que limita a sua utilização.

Ambas as técnicas de LLE e SPE possuem desvantagens e vantagens entre elas e em relação a outras opções.

As desvantagens da técnica de LLE em relação à técnica de SPE são:

- O uso de elevados volumes de solventes orgânicos;
- Mais trabalhosa e maior tempo de exposição aos solventes orgânicos;
- Menos seletiva;
- Limitada seleção de solventes;
- Não pode ser completamente automatizada.

As vantagens da técnica de LLE são a possibilidade de extrair vários compostos muito diferentes ao mesmo tempo, e estar limitada ao volume das ampolas de decantação, o que permite extrair amostras de um volume superior ao que pode ser usado em SPE, pois os cartuchos de SPE geralmente começam a perder reprodutibilidade quando se utiliza volumes superiores a 1 – 1,8 l, para além dos possíveis efeitos de *breakthrough*.

8 Método experimental

8.1 Equipamento

UPLC-MS/MS:

- Cromatógrafo líquido de ultra eficiência: Waters Acquity Ultra Performance LC™ equipado com:
 - Amostrador automático: Acquity ACQ-SM;
 - Misturador de solvente binário: Acquity ACQ-BSM;
 - Controlador de condições de coluna: Acquity ACQ-CM.
- Espectrómetro de massas (MS/MS): Waters TQ Detector:
 - Sonda de Ionização em *electrospray* (API);
 - Analisador de Triplo Quadrupolo com célula de colisão T-Wave™;
 - Fotomultiplicador.
- Gerador de Azoto, Domnick Hunter;
- Compressor de ar, Worthington Creyssensac;
- Software MassLynx V4.1 SCN 714, © 2009 Waters Inc para controlo de sistema e aquisição de dados;
- Coluna cromatográfica: Waters Acquity UPLC® BEH C18, dimensões: 2,1 x 50 mm, dimensão de partícula: 1,7 µm.

GC-ECD:

- Cromatógrafo gasoso HP 6890A Series, equipado com:
 - Injetor automático: Agilent 7683 Series;
 - Detetor de Captura Eletrónica (ECD);
 - Detetor de Captura microeletrónica (µECD).
- Software Empower 2, © 2005 Waters Corporation.
- Colunas cromatográficas:
 - Agilent Technologies HP-5MS, comprimento 30 m, diâmetro interno 0,32 mm, espessura da fase estacionária 0,25 µm;
 - Phenomenex Zebron ZB-MultiResidue-2, comprimento 30 m, diâmetro interno 0,32 mm, espessura da fase estacionária 0,25 µm.

Sistema de extração e concentração de amostras:

- Equipamento automatizado de extração em fase sólida Caliper LifeScience AutoTracer SPE Workstation, com software Autotracer SPE Workstation Cartridge model, © 2005 Caliper LifeScience, Inc.;
- Agitador automático de ampolas de extração Agitelec;
- Sistema de evaporação sob fluxo de azoto Zymark TurboVap® II Concentration Workstation;
- Turbos de evaporação Zymark de 200 ml, graduados para 0,5 e 1 ml.

Balanças analíticas:

- Mettler Toledo XS204;
- Mettler Toledo NewClassic MF, modelo MS3002S /01.

Sistema de água Ultrapura Milli-Q, Millipore;

Micropipeta automática Analytical Science Evol® com seringa de vidro;

Vortex IKA® MS3 Digital;

Mufla Nabertherm.

8.1.1 Materiais

Ampolas de extração de 2,5 l;

Frascos de vidro escuro de 2,5 l;

Balões de vidro de 5 l;

Vials de vidro escuro de 1,5 ml com tampa com fenda de PTFE/silicone, Supelco (para LC);

Vials de vidro escuro de 1,5 ml com etiqueta, VWR (para GC);

Tampas para *vials* PP Blue, de 9 mm em PTFE/Silicone, VWR (para GC);

Seringas de plástico sem agulha Terumo de 2 ml;

Seringa de vidro manual Agilent Technologies de 100 e 250 µl;

Lã de vidro: Supelco Glass Wool-silane treated.

Filtros:

- GHP Acrodisc 13 mm Ø, 0,45 µm;
- IC Acrodisc 13 mm Ø, 0,45 µm;
- Nylaflo Nylon Membrane Filter, 47 mm Ø, 0,20 µm;
- Regenerated Cellulose, 30 mm Ø, 0,45 µm;
- Whatman Glass Microfiber Filters, 47 mm Ø.

Cartuchos de SPE:

- Chomabond HR-P, 6 ml, 500 mg;
- Isolute C18 (EC), 6 ml, 1 g;
- Oasis HLB, 6 ml, 200 mg.

Material de laboratório de uso corrente.

8.2 Reagentes gerais

Gases:

- Árgon (Ar) 6.0, 99,99990 %, Gasin II – em garrafa, gás de colisão para o UPLC-MS/MS;
- Árgon-Metano (Ar/CH₄) PR5, 95% árgon, 5% metano, Gasin II – gás auxiliar para o detetor de ECD;
- Azoto (N₂) – proveniente do gerador de azoto para o UPLC-MS/MS gás de nebulização, dessolvatação e cone;
- Azoto (N₂) 5.2 Premier, pureza 99,9992 %, Gasin II – em garrafa para o sistema de extração e concentração de amostras (SPE e *Turbovap*);
- Helio (He) 5.5 BIP, 99,9995, Gasin II – gás de arraste para o GC-ECD.

Líquidos:

- Acetona (CH_3COCH_3) para cromatografia gasosa ECD e FID SupraSolv®, Merck;
- Ácido fórmico (CH_2O_2) 98-100% adequado para utilização como excipiente EMPROVE® exp DAC, Merck;
- Água Ultrapura;
- Diclorometano (CH_2Cl_2) Chromasolv® para HPLC, 99,8 %, contém amileno como estabilizador, Sigma-Aldrich;
- n-Hexano ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$) para análise de traços orgânicos UniSolv®, Merck;
- Metanol (CH_3OH) hypergrade para a cromatografia líquida LC-MS LiChrosolv®, Merck.

Sólidos:

- Acetato de amônio ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) para análise EMSURE® ACS, Reag. Ph Eur, Merck;
- Cobre (Cu) pó fino, granulometria: $<63 \mu\text{m}$ (> 230 mesh ASTM) EMSURE®, Merck;
- Florisil® (0,150 – 0,250 mm) para análise de resíduos, Merck, seco em mufla 140 °C por 16 horas;
- Sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) para análise EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph Eur, Merck, seco em mufla a 400 °C por 4 horas;
- Tiosulfato de sódio pentahidratado ($\text{Na}_2\text{O}_3\text{S}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) para análise EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph Eur, Merck.

8.3 Padrões comerciais de Pesticidas

- Aclonifena ($\text{C}_{12}\text{H}_9\text{ClN}_2\text{O}_3$), 99,0 %, Dr. Ehrenstorfer;
- Azoxistrobina, ($\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_5$), 99,5 %, Dr. Ehrenstorfer;
- Bifenox, ($\text{C}_{14}\text{H}_9\text{Cl}_2\text{NO}_5$), 98,0 %, Dr. Ehrenstorfer;
- alfa-Cipermetrina, ($\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{Cl}_2\text{NO}_3$), 97,5 %, Dr. Ehrenstorfer;
- beta-Cipermetrina, ($\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{Cl}_2\text{NO}_3$), 99,0 %, Dr. Ehrenstorfer;
- teta-Cipermetrina, ($\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{Cl}_2\text{NO}_3$), 95,5 %, Dr. Ehrenstorfer;
- zeta-Cipermetrina, ($\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{Cl}_2\text{NO}_3$), 96,0 %, Dr. Ehrenstorfer;

- Deltametrina, (C₂₂H₁₉Br₂NO₃), 99,5 %, Dr. Ehrenstorfer;
- Diclorvos, (C₄H₇Cl₂O₄P), 98,0 %, Dr. Ehrenstorfer;
- Dicofol, (C₁₄H₉Cl₅O), 99,0 %, Dr. Ehrenstorfer;
- Etoprofos, (C₈H₁₉O₂PS₂), 93,0 %, Dr. Ehrenstorfer;
- Iprodiona, (C₁₃H₁₃Cl₂N₃O₃), 98,0 %, Dr. Ehrenstorfer;
- Metomil, (C₅H₁₀N₂O₂S), 98,5 %, Dr. Ehrenstorfer;
- Ometoato, (C₅H₁₂NO₄PS), 98,0 %, Dr. Ehrenstorfer;
- Quinoxifena, (C₁₅H₈Cl₂FNO), 99,0 %, Dr. Ehrenstorfer;
- Terbutrina, (C₁₀H₁₉N₅S), 99,0 %, Dr. Ehrenstorfer;
- Tiodicarbe, (C₁₀H₁₈N₄O₄S₃), 99,0 %, Dr. Ehrenstorfer.

8.4 Amostras

Matriz água para consumo humano:

- Água da torneira do laboratório;
- Pontos da rede de distribuição da EPAL.

Matriz água superficial:

- Barragem de Castelo de Bode;
- Captação Valada Tejo.

Matriz água subterrânea:

- Furos das Lezírias;
- Furos da OTA.

8.5 Preparação de soluções

8.5.1 Solventes e fase móvel para UPLC-MS/MS

Solução aquosa de acetato de amónio 5 mM

Para um balão volumétrico de 500 ml, pesou-se com rigor aproximadamente 0,19 g de acetato de amónio e diluiu-se em 500 ml de água ultrapura.

Solvente água:metanol (9:1), com 0,1 mM de acetato de amónio

Para um balão volumétrico de 1 l, a 880 ml de água ultrapura, adicionou-se 20 ml da solução aquosa de acetato de amónio 5 mM e 100 ml de metanol.

Fase móvel A: água ultrapura, com 0,1 mM acetato de amónio e 0,5 % ácido fórmico

Para um balão volumétrico de 1 l, a 980 ml de água ultrapura filtrada por uma membrana filtrante de nylon de 0,2 µm de porosidade, adicionou-se 20 ml da solução aquosa de acetato de amónio 5 mM e 5 ml de ácido fórmico.

Fase móvel B e solvente de lavagem forte de seringa

Metanol puro filtrado com recurso a uma membrana filtrante de nylon de 0,2 µm de porosidade.

Lavagem fraca de seringa, selo e solvente: água:metanol (7:3)

Para um balão volumétrico de 1 l, filtrou-se com recurso a uma membrana filtrante de nylon de 0,2 µm de porosidade 700 ml de água ultrapura e 300 ml de metanol, tendo-se agitado bem.

8.5.2 Soluções padrão

8.5.2.1 *Soluções padrão primárias*

A preparação das soluções padrão primárias foi feita pesando rigorosamente numa balança analítica calibrada cerca de 20 mg do padrão comercial diretamente para um balão volumétrico de 50 ml. Estas soluções foram preparadas em metanol para uso em LC, tendo sido posteriormente preparadas soluções padrão primárias para os pesticidas analisados por GC em acetona.

A pesagem dos padrões comerciais dos pesticidas líquidos foi feita recorrendo a uma seringa de vidro para fazer a transferência do líquido. Para o pesticida zeta-cipermetrina, devido à sua elevada viscosidade, a pesagem foi feita pesando em copo e com espátula. A massa pesada deste pesticida foi dissolvida com um pouco de solvente e transferida para um balão volumétrico. Para os restantes pesticidas a pesagem foi feita com recurso a uma espátula para transferir o pesticida diretamente para um balão volumétrico.

Devido ao padrão comercial do pesticida teta-cipermetrina ser uma solução de 10 mg/l em ciclohexano, não se preparou uma solução padrão primária para este.

Todas as soluções padrão primárias possuem 1 ano de validade, tendo sido guardadas num frigorífico a aproximadamente 4 °C e ao abrigo da luz.

Na Tabela 8.1 apresenta-se a massa pesada de cada padrão comercial de pesticida, bem como a concentração das soluções padrão primárias corrigidas com a pureza dos padrões comerciais de pesticidas.

Tabela 8.1: Massa pesada para a preparação das soluções padrão primário e a concentração das mesmas, corrigida com a pureza do padrão comercial.

Pesticida	Para utilizar em UPLC		Para utilizar em GC		
	Solvente: metanol		Solvente: acetona		
	Massa pesada (mg)	Concentração (mg/l)	Massa pesada (mg)	Concentração (mg/l)	
Aclonifena	19,7	390	23,1	457	
Azoxistrobina	19,9	396	-	-	
Bifenox	20,4	400	-	-	
Cipermetrina	alfa	21,6	421	21,0	410
	beta	20,0	396	19,4	384
	teta¹	-	-	-	-
	zeta	20,7	397	20,7	397
Deltametrina	20,3	406	24,3	484	
Dicofol	20,1	398	19,7	390	
Diclorvos	19,9	390	-	-	
Etoprofos	18,5	344	-	-	
Iprodiona	19,7	386	20,0	392	
Metomil	20,4	402	-	-	
Ometoato	18,6	365	-	-	
Quinoxifena	19,8	392	21,2	420	
Terbutrina	22,7	449	-	-	
Tiodicarbe	19,6	388	-	-	

¹ Padrão comercial apenas disponível como solução de 10 mg/l em ciclohexano.

8.5.2.2 Soluções padrão para o método de UPLC-MS/MS

8.5.2.2.1 Solução padrão conjunta

A solução padrão conjunta deste grupo foi feita diluindo 0,5 ml de solução padrão primária de azoxistrobina, diclorvos, etoprofos, metomil, ometoato, terbutrina e tiodicarbe num balão volumétrico de 50 ml, perfazendo-o com metanol. Esta solução padrão conjunta foi acondicionada da mesma forma que as soluções padrão primárias, tendo uma validade de 6 meses.

8.5.2.2.2 Solução padrão intermédia I

A solução padrão intermédia I foi preparada colocando 0,5 ml da solução conjunta (8.5.2.2.1) e 3,75 ml de solução padrão primária de bifenox num balão volumétrico de 25 ml, perfazendo-o com metanol. Esta solução padrão intermédia foi acondicionada da mesma forma que as soluções padrão primárias, tendo uma validade de 3 meses.

Tabela 8.2: Concentração dos pesticidas na solução padrão intermédia I.

Pesticida	Volume pipetado de solução padrão primária (ml)	Volume do balão (ml)	Concentração (µg/l)
Azoxistrobina	0,50	25	79,2
Bifenox*	3,75		60,0 x 10 ³
Diclorvos			78,0
Etoprofos			68,8
Metomil	0,50		80,4
Ometoato			72,9
Terbutrina			89,9
Tiodicarbe			77,6

¹ Solução padrão primário, apenas adicionada na solução padrão intermédia I.

8.5.2.2.3 Solução padrão Intermédia II

A solução padrão intermédia II foi preparada colocando 0,5 ml da solução intermédia I num balão volumétrico de 50 ml perfazendo-o com o solvente água:metanol (9:1), com 0,1 mM de acetato de amónio. Esta solução foi preparada diariamente.

8.5.2.2.4 Soluções padrão de calibração

Partindo da solução padrão intermédia II obtiveram-se diversas soluções padrão de calibração necessárias ao traçado da curva de calibração, utilizando como solvente água:metanol (9:1), com 0,1 mM de acetato de amónio. Estas soluções foram preparadas diariamente. Na Tabela 8.3 são apresentadas as gamas de trabalho validadas.

Tabela 8.3: Concentração dos pesticidas nas várias soluções padrão de calibração.

Pesticida	Concentração ($\mu\text{g/l}$) (V solução padrão intermédia II (ml) / V balão (ml))								
	P1 (0,5/25)	P2 (0,75/25)	P3 (1/25)	P4 (1,5/25)	P5 (2/25)	P6 (1/10)	P7 (1,2/10)	P8 ² (1,4/10)	P9 ^{2,3} (1,66/10)
Azoxistrobina	0,016	0,024	0,032	0,048	0,063	0,079	0,095	0,11	0,13
Bifenox¹	12	18	24	36	48	60	72	84	100
Diclorvos	0,016	0,023	0,031	0,047	0,062	0,078	0,094	0,11	0,13
Etoprofos	0,014	0,021	0,028	0,041	0,055	0,069	0,083	0,096	0,11
Metomil	0,016	0,024	0,032	0,048	0,064	0,080	0,096	0,11	0,13
Ometoato	0,015	0,022	0,029	0,044	0,058	0,073	0,087	0,10	0,12
Terbutrina	0,018	0,027	0,036	0,054	0,072	0,090	0,11	0,13	0,15
Tiodicarbe¹	0,016	0,023	0,031	0,047	0,062	0,078	0,093	0,11	0,13

¹ Pesticidas presentes em praticamente todo o trabalho mas não validados.

² Solução padrão de calibração que não faz parte de gama de linearidade do pesticida terbutrina.

³ Solução padrão de calibração apenas para o pesticida bifenox.

8.5.2.2.5 Soluções padrão de controlo

Estas soluções padrão foram preparadas de forma idêntica às soluções padrão de calibração de forma independente e idêntica à preparação das soluções padrão de calibração P2 e P7.

8.5.2.2.6 Fortificação de amostras

Para este método a fortificação foi preparada colocando uma quantidade apropriada de solução padrão intermédia II num balão volumétrico de volume apropriado para obter a concentração dos analitos que se pretende simular na matriz em estudo, perfazendo-se o volume do balão volumétrico com a amostra representativa da matriz em estudo.

A concentração da fortificação dependeu do método de preparação de amostra em estudo e da concentração que se pretendia validar.

Esta amostra fortificada foi depois submetida ao processo de preparação de amostra em estudo.

8.5.2.3 Soluções padrão para o método de GC-ECD

8.5.2.3.1 Solução padrão conjunta

A solução padrão conjunta deste grupo foi feita colocando um volume específico de solução padrão primária de cada um dos pesticidas, exceto teta-cipermetrina para balão volumétrico de 50 ml, perfazendo-o com acetona. Esta solução padrão conjunta foi acondicionada da mesma forma que as soluções padrão primárias, tendo uma validade de 6 meses.

Tabela 8.4: Concentração dos pesticidas na solução padrão conjunta.

Pesticida	Volume pipetado de solução padrão primária (ml)	Volume do balão (ml)	Concentração (mg/l)
Aclonifena	0,55		5,03
Cipermetrina	alfa	0,62	5,08
	beta	0,66	5,07
	teta	-	-
	zeta	0,62	4,93
Deltametrina	2,6		25,1
Dicofol	0,65		5,07
Iprodiona	2,56		20,1
Quinoxifena	0,60		5,04

8.5.2.3.2 Solução padrão intermédia

A solução padrão intermédia foi feita colocando 1 ml da solução padrão conjunta e 0,5 ml do padrão comercial de teta-cipermetrina num balão volumétrico de 10 ml, perfazendo-o com acetona.

Esta solução padrão intermédia foi preparada a cada 48 horas, possuindo uma validade de cerca de 48 horas devido à evaporação de solvente, podendo este prazo ser mais elevado se as soluções forem congeladas. No entanto, o volume está dimensionado para utilizar o mínimo possível de padrão comercial de teta-cipermetrina, sendo este o volume apropriado à preparação de uma curva de calibração.

Tabela 8.5: Concentração dos pesticidas na solução padrão intermédia.

Pesticida	Volume pipetado de solução padrão primária (ml)	Volume do balão (ml)	Concentração (mg/l)
Aclonifena			0,503
Cipermetrina	alfa	1,0	0,508
	beta		0,507
	teta¹	0,5	0,500
	zeta		0,493
Deltametrina			2,51
Dicofol	1,0		0,507
Iprodiona²			2,01
Quinoxifena²			0,504

¹teta-cipermetrina apenas adicionado na solução intermédia.

²Pesticidas presentes em praticamente todo o trabalho mas não validados.

8.5.2.3.3 Soluções padrão de calibração

Partindo da solução padrão intermédia obtiveram-se diversas soluções de calibração necessárias ao traçado da curva de calibração. Na Tabela 8.6 apresentam-se as gamas de trabalho validadas.

Estas soluções de calibração foram preparadas a cada 48 horas, possuindo uma validade de cerca de 48 horas devido a evaporação de solvente, podendo o prazo ser mais elevado se as soluções forem congeladas.

Tabela 8.6: Concentração dos pesticidas nas várias soluções padrão de calibração.

Pesticida	Concentração (µg/l)										
	(V solução padrão intermédia (ml) / V balão (ml))										
	P1 ¹	P2 ¹	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11 ¹
	(0,5/50)	(0,5/25)	(0,5/20)	(0,6/20)	(0,8/20)	(0,5/10)	(0,6/10)	(0,7/10)	(0,8/10)	(0,9/10)	(0,5/5)
Aclonifena	5,0	10	13	15	20	25	30	35	40	45	50
Cipermetrina total	20	40	50	60	80	100	120	141	161	181	201
Deltametrina	25	50	63	75	101	126	151	176	201	226	251
Dicofol	5,1	10	13	15	20	25	30	35	41	46	51
Iprodiona	20	40	50	60	80	100	120	140	161	181	201
Quinoxifena	5,0	10	13	15	20	25	30	35	40	45	50

¹Soluções padrão de calibração que não fazem parte da gama de linearidade dos pesticidas cipermetrina total e deltametrina.

8.5.2.3.4 Solução padrão de fortificação

Com vista a executar a fortificação a uma concentração real igual ou inferior a 0,03 µg/l para todos os pesticidas deste grupo preparou-se uma solução padrão conjunta independente partindo das mesmas soluções padrão primárias, medindo o volume apropriado de cada uma destas para um balão volumétrico de 50 ml e perfazendo-o com acetona.

Tabela 8.7: Concentração dos pesticidas na solução padrão conjunta de fortificação.

Pesticida	Volume pipetado de solução padrão primária (ml)	Volume do balão (ml)	Concentração (mg/l)
Aclonifena	0,55	50	5,03
alfa	0,65		5,32
beta	0,70		5,38
teta¹	–		–
zeta	0,67		5,33
Deltametrina	2,2		21,3
Dicofol	0,65		5,07

¹teta-cipermetrina apenas adicionado na solução intermédia.

A solução padrão intermédia de fortificação foi preparada colocando 1 ml da solução padrão conjunta e 0,53 ml do padrão comercial de teta-cipermetrina num balão volumétrico de 10 ml, perfazendo-o com acetona.

A solução padrão de fortificação foi preparada colocando 0,7 ml da solução padrão intermédia de fortificação num balão volumétrico de 10 ml, à semelhança da preparação da solução padrão de calibração P8.

Tabela 8.8: Concentração dos pesticidas na solução padrão de fortificação.

Pesticida	Volume pipetado de solução Intermédia Independente (ml)	Volume do balão (ml)	Concentração (µg/l)
Aclonifena	0,7	10	35
Cipermetrina total			149
Deltametrina			149
Dicofol			35

As soluções padrão conjunta de fortificação, intermédia de fortificação e de fortificação possuindo a mesma validade que as soluções padrão conjunta, intermédia e de calibração da preparação da curva de calibração.

8.5.2.3.5 Solução padrão de controlo

Estas soluções foram preparadas de forma a corresponder à concentração das soluções padrão de calibração P3 e P10, sendo também analisada a solução padrão de fortificação como controlo independente do ensaio de recuperação.

8.5.2.3.6 Fortificação de amostras

Para este método a fortificação das amostras foi feita colocando 1 ml da solução padrão de fortificação num balão volumétrico de 5 l para a concentração mais baixa e 2 ml no mesmo volume para a concentração correspondente ao meio da gama de trabalho.

Tabela 8.9: Concentração dos pesticidas na amostra fortificada.

Pesticida	Concentração fortificação (µg/l) (V solução padrão (ml) / V balão (l))	
	Gama baixa (1/5)	Gama alta (2/5)
Aclonifena	0,0070	0,014
Cipermetrina total	0,030	0,060
Deltametrina	0,030	0,060
Dicofol	0,0070	0,014

8.6 Condições Cromatográficas

8.6.1 UPLC-MS/MS

Nos itens que se seguem apresentam-se as várias condições de operação associadas ao método de UPLC-MS/MS.

8.6.1.1 Condições de injeção, amostrador e forno da coluna cromatográfica

Volume de injeção: 20 µl

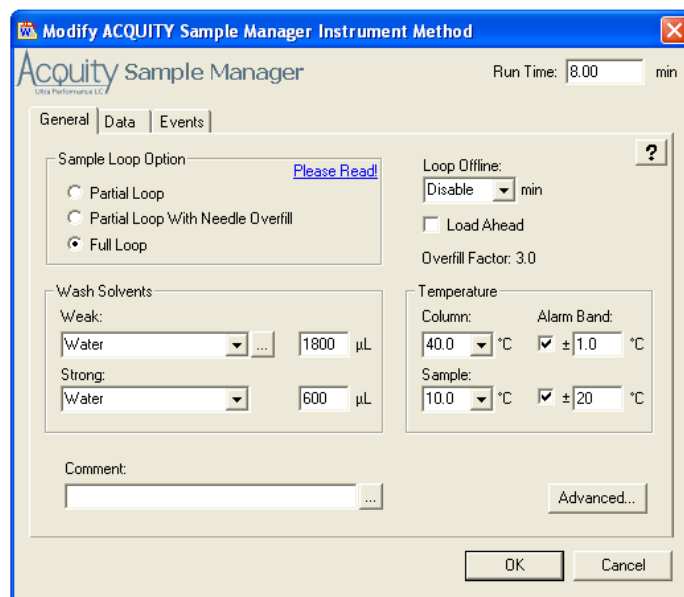


Figura 8.1: Condições de injeção, amostrador e temperatura da coluna cromatográfica.

8.6.1.2 Condições da bomba

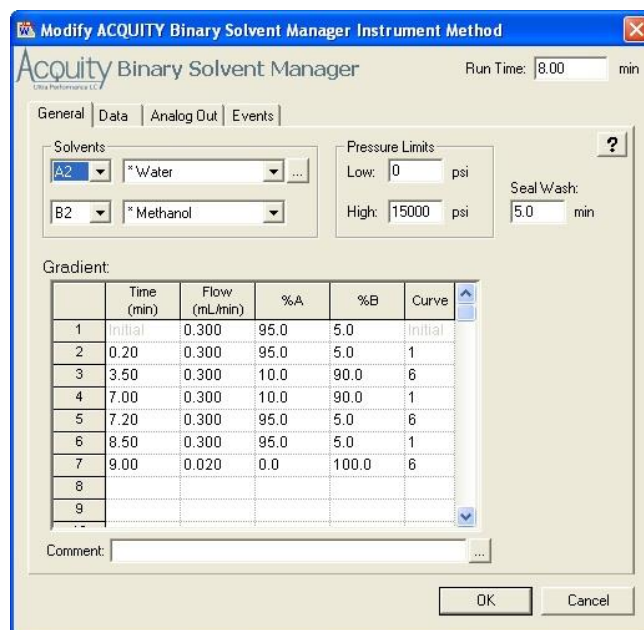


Figura 8.2: Condições de fluxo e gradiente da bomba.

Solvente A2: água ultrapura, com 0,1 mM acetato de amônio e 0,5 % ácido fórmico;

Solvente B2: Metanol;

Solução de lavagem: água:metanol (7:3).

8.6.1.3 Condições do espectrômetro de massas

8.6.1.3.1 Condições de aquisição de dados

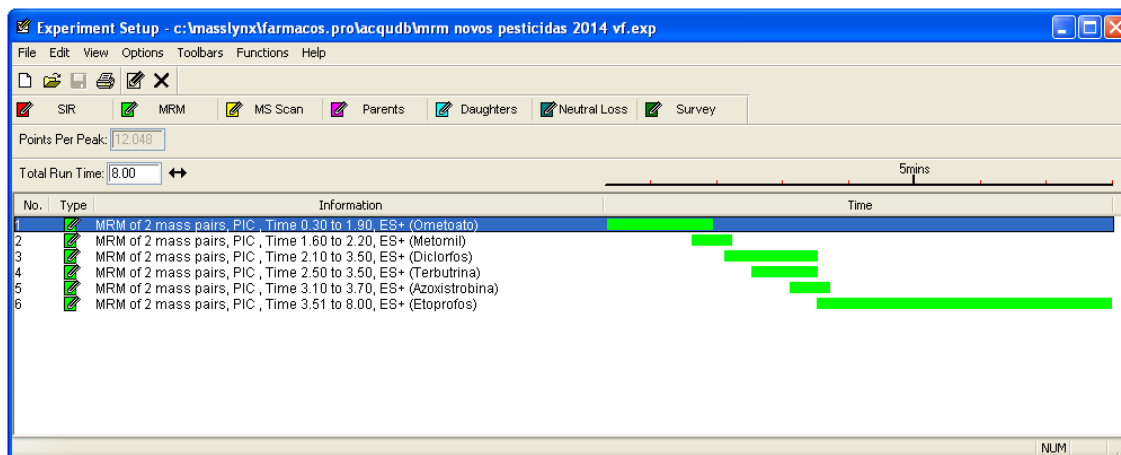


Figura 8.3: Janela de programação de aquisição de dados para o grupo final de pesticidas de UPLC-MS/MS.

As voltagens de cone utilizadas para a formação dos íons precursoros, bem como as transições de quantificação (MRM1) e confirmação (MRM2) otimizadas para os pesticidas do grupo final encontram-se na Tabela 8.10.

Tabela 8.10: Voltagem de cone otimizada para a formação dos íons precursoros e energia de colisão aplicada para a formação dos íons de quantificação e confirmação.

Pesticida	Modo de Ionização	Íon precursor	Voltagem de Cone (V)	Íon Produto Quantificação (MRM1)	Energia de Colisão (eV)	Íon Produto Confirmação (MRM2)	Energia de Colisão (eV)
Ometoato	ESI +	214,1	20	183,1	10	125,4	20
Metomil	ESI+	163,0	10	88,0	11	105,9	8
Diclorvos	ESI+	221,0	32	109,3	18	-	-
		223,0	32	-	-	109,2	15
Terbutrina	ESI +	242,5	30	186,4	17	91,2	27
Azoxistrobina	ESI +	404,0	27	372,0	15	329,1	30
Etoprofos	ESI +	243,1	24	97,0	33	173,0	15

Estas condições são programadas em janelas semelhantes à apresentada na Figura 8.4, mantendo constante o *Span* e *Auto Dwell*.

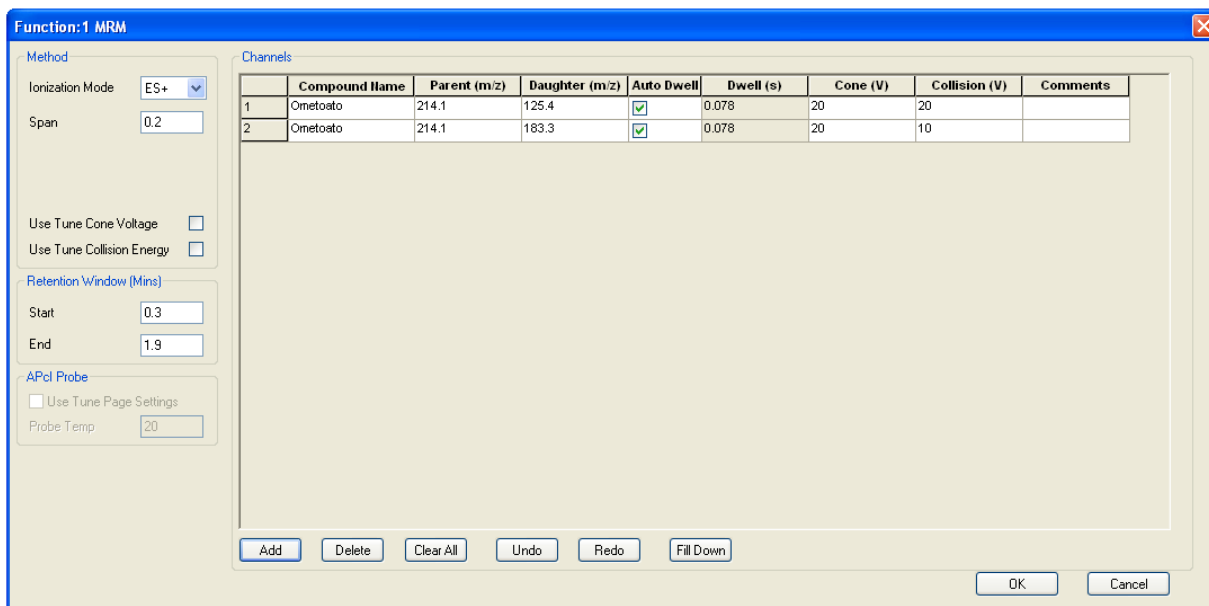


Figura 8.4: Janela de programação das condições de MRM.

8.6.1.3.2 Condições de operação da fonte e detetor

Na Figura 8.5 apresentam-se as condições utilizadas tanto da fonte como do analisador de massas.

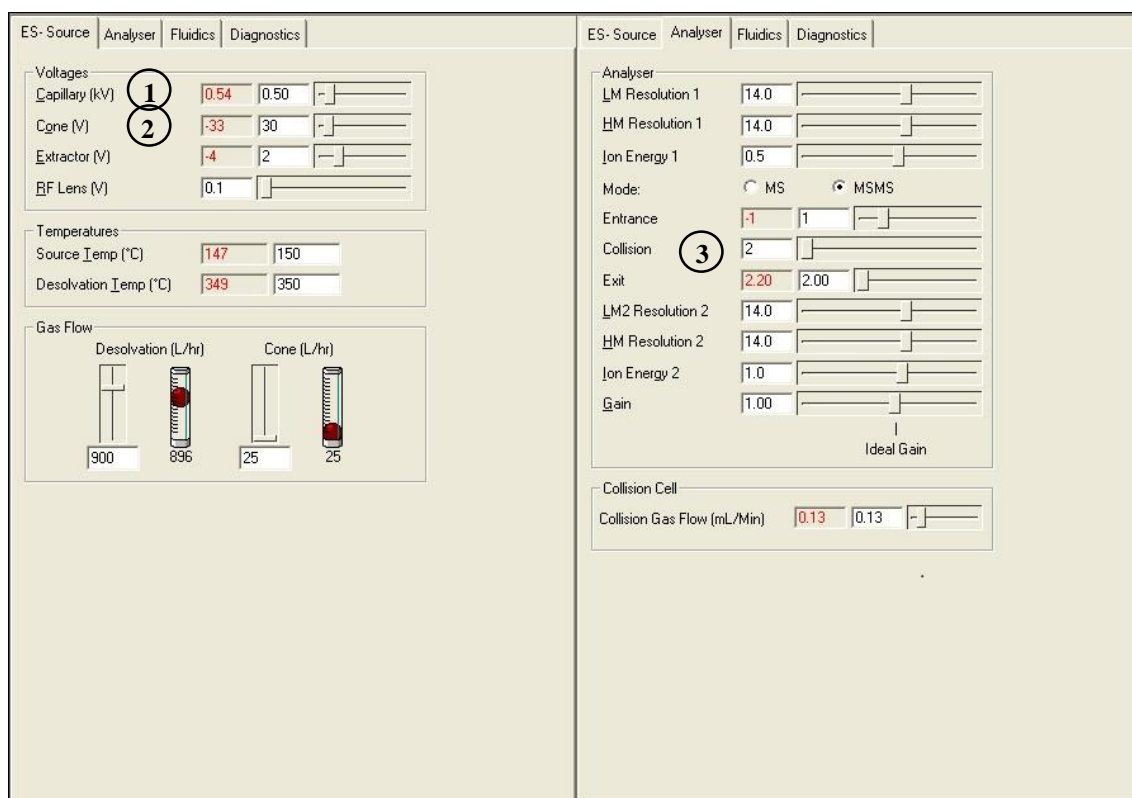


Figura 8.5: Condições de operação do espectrómetro de massas - fonte e analisador de massas. 1. tensão do capilar, 2. voltagem de cone, 3. energia de colisão.

8.6.2 GC-ECD

Nos itens que se seguem apresentam-se as várias condições de operação associadas ao método de GC-ECD.

8.6.2.1 Coluna Phenomenex Zebrom ZB-Multiresidue-2

8.6.2.1.1 Condições da coluna e gás de arraste

Na Figura 8.6 apresenta-se as propriedades da coluna cromatográfica Phenomenex Zebrom ZR-Miltiresidue-2, bem como as condições do gás de arraste.

The screenshot displays a software interface for configuring a chromatography column. The interface is divided into several sections:

- General**: Contains fields for Column Information and Settings.
- Column Information**: Includes Length (m) set to 30.00, Diameter (µ) set to 320, Film Thickness (µ) set to 0.25, Outlet Pressure Mode set to Ambient, and Pressure set to 0.00 psi. The Description is Zebrom Multi 2 and the Gas Type is Helium.
- Settings**: Includes Mode set to Constant Flow, Initial Pressure/Flow set to 0.40, and Initial Time set to 0.00 min.
- Table**: A table with 5 columns: Rate, Final, Hold Time, and Total Time. The table is currently empty.

	Rate	Final	Hold Time	Total Time

Figura 8.6: Propriedades da coluna cromatográfica e condições do gás de arraste.

8.6.2.1.2 Condições de funcionamento do injetor

Volume de injeção: 1,00 µl

Front Detector | Channel 1 | Back Injector | Back Inlet | Column 2 | Back Detector | Channel 2
General | Oven | Auxiliary | Events | Valves | Front Injector | **Front Inlet** | Column 1

Settings
Inlet Type: S/SL EPC Mode: Splitless

Temperature
 Temp Enable Initial Temp: 250 Initial Time: 0,00
 Track Oven
 Enable Ramps

	Rate	Final	Hold Time	Total Time

Purge
On Time: 0,75 Flow: 20,0
Sampling
End Time:

Gas Saver
 Enable
On Time: 2,00 Flow: 20,0

Split/Splitless
Split Ratio: 0,10
Split Flow: 0,00
Pulse Time: 0,00
Pulse Pressure: 0,0

Vent
End Time: 0,00
Flow: 0,1
Pressure: 0,0

Figura 8.7: Condições do funcionamento do injeção e modo de injeção.

8.6.2.1.3 Condições de funcionamento do forno

Front Detector | Channel 1 | Back Injector | Back Inlet | Column 2 | Back Detector | Channel 2
General | **Oven** | Auxiliary | Events | Valves | Front Injector | Front Inlet | Column 1

Oven Settings
 Oven Enable Cryo Enable Temperature Ramp Enable
Maximum Temperature: 320 Equilibrium Time: 1,00
Initial Temperature: 80 Initial Time: 1,00

	Rate	Final	Hold Time	Total Time
1	10,00	300,0	10,00	33,00

Figura 8.8: Condições de funcionamento do forno e rampa de temperaturas.

8.6.2.1.4 Condições de funcionamento do detetor

General | Oven | Auxiliary | Events | Valves | Front Injector | Front Inlet | Column 1
Front Detector | Channel 1 | Back Injector | Back Inlet | Column 2 | Back Detector | Channel 2

Settings
Detector Type: uECD Flame Enable
Target Output: 30 Filament Enable

Temperature Settings
 Enable Setpoint: 320

Polarity Settings
Neg Polarity: Off Switch Time: 0,00

Pneumatics
Oxidizer Flow: 1 Fuel Flow: 1,0
Flow Mode: Constant Makeup + Column Makeup/Combo Flow: 60,0
Makeup Gas: Argon / Methane

Figura 8.9: Condições de funcionamento do detetor, temperatura e gás auxiliar.

8.6.2.2 Coluna Agilent Technologies HP-5MS

8.6.2.2.1 Condições da coluna e gás de arraste

Na Figura 8.6 apresenta-se as propriedades da coluna cromatográfica Agilent Technologies HP-5MS, bem como as condições do gás de arraste.

General | Oven | Auxiliary | Events | Valves | Front Injector | Front Inlet | Column 1
Front Detector | Channel 1 | Back Injector | Back Inlet | Column 2 | Back Detector | Channel 2

Column Information
Length (m): 30,00 Description: HP5MS-30M
Diameter (u): 320 Serial Number:
Film Thickness (u): 0,25 Gas Type: Helium
Outlet Pressure Mode: Ambient Pressure: 0,00 psi

Settings
Mode: Constant Flow
Initial Pressure/Flow: 0,40 Initial Time: 0,00 min

	Rate	Final	Hold Time	Total Time

Figura 8.10: Propriedades da coluna cromatográfica e condições do gás de arraste.

8.6.2.2.2 Condições de funcionamento do injetor

Volume de injeção: 1,00 µl

General | Oven | Auxiliary | Events | Valves | Front Injector | Front Inlet | Column 1
 Front Detector | Channel 1 | Back Injector | **Back Inlet** | Column 2 | Back Detector | Channel 2

Settings
 Inlet Type: S/SL EPC Mode: Splitless

Temperature
 Temp Enable Initial Temp: 250 Initial Time: 0,00
 Track Open
 Enable Ramps

	Rate	Final	Hold Time	Total Time

Purge
 On Time: 0,75 Flow: 20,0 End Time:

Sampling
 End Time:

Gas Saver
 Enable
 On Time: 2,00 Flow: 20,0

Split/Splitless
 Split Ratio: 0,10 Split Flow: 0,00
 Pulse Time: 0,00 Pulse Pressure: 0,0

Vent
 End Time: 0,00 Flow: 0,1 Pressure: 0,0

Figura 8.11: Condições do modo de injeção.

8.6.2.2.3 Condições de funcionamento do forno

Front Detector | Channel 1 | Back Injector | Back Inlet | Column 2 | Back Detector | Channel 2
 General | **Oven** | Auxiliary | Events | Valves | Front Injector | Front Inlet | Column 1

Oven Settings
 Oven Enable Cyo Enable Temperature Ramp Enable
 Maximum Temperature: 290 Equilibrium Time: 1,00
 Initial Temperature: 80 Initial Time: 1,00

	Rate	Final	Hold Time	Total Time
1	30,00	200,0	3,00	8,00
2	10,00	250,0	0,00	13,00
3	1,00	260,0	0,00	23,00
4	5,00	290,0	10,00	39,00
5	50,00	60,0	0,00	43,60

Figura 8.12: Condições de funcionamento do forno e rampa de temperaturas.

8.6.2.2.4 Condições de funcionamento do detetor

General	Oven	Auxiliary	Events	Valves	Front Injector	Front Inlet	Column 1
Front Detector	Channel 1	Back Injector	Back Inlet	Column 2	Back Detector	Channel 2	

Settings:

Detector Type: Flame Enable

Target Output: Filament Enable

Temperature Settings:

Enable Setpoint

Polarity Settings:

Neg Polarity: Switch Time

Pneumatics:

Oxidizer Flow: Fuel Flow:

Flow Mode: Makeup/Combo Flow:

Makeup Gas:

Figura 8.13: Condições de funcionamento do detetor, temperatura e gás auxiliar.

8.7 Preparação de amostras

Para ambas as técnicas a recolha das amostras é feita em frascos de vidro escuro de 2,5 l, aos quais foi adicionado 150 mg/l de tiosulfato de sódio para evitar a degradação dos pesticidas.

8.7.1 UPLC-MS/MS

Avaliaram-se dois métodos de preparação de amostra para as análises por esta técnica, sendo estas baseadas no método de injeção direta em LC.

Nos ensaios de recuperação, a fortificação deve ser executada antes do passo de filtração da amostra.

8.7.1.1 Injeção direta simples

Neste método a amostra foi analisada diretamente pelo equipamento, sendo a amostra apenas filtrada por um filtro microporoso GHP Acrodisc de 30 mm Ø e 0,45 µm de dimensão de poro.

8.7.1.2 *Injeção direta com diluição em solvente*

Neste método a amostra foi filtrada como para o método anterior, sendo que a amostra depois de filtrada foi diluída na razão 1:1 com o solvente água:metanol (9:1), com 0,1 mM de acetato de amónio usado para preparar a curva de calibração.

8.7.1.3 *Filtros*

Testaram-se vários filtros para verificar se estes retinham algum dos analitos em análise e ao mesmo tempo se proporcionavam uma adequada remoção de partículas em suspensão eventualmente presentes na amostra.

Tabela 8.11: Filtros avaliados.

Filtro	Diâmetro de disco (mm)	Dimensão de poro (µm)	Notas
Regenerated Cellulose	30	0,45	Filtro Pré-preparado comercial
IC Acrodisc	13	0,45	
GHP Acrodisc	13	0,45	
Whatman Glass Microfiber Filter	30	-	Filtro preparado pela introdução de 0,5 ou 1 disco dentro de uma seringa descartável.
Nylaflo Nylon Membrane Filter	47	0,20	

8.7.2 **GC-ECD**

Avaliaram-se dois métodos de preparação de amostra para as análises por esta técnica: extração em fase sólida (SPE) e extração líquido-líquido (LLE).

8.7.2.1 *Extração em fase sólida (SPE)*

Para esta técnica utilizou-se o método para pesticidas organoclorados desenvolvido e utilizado no laboratório, devido ao mesmo estar validado para um volume máximo compatível com o pretendido, não tendo sido necessário fazer alterações a este método de forma a obter o fator de concentração de 4000 vezes.

Name: POC
 Samples: 6 Solvent Set: Pesticidas

Condition column

	Min.	Max.	
Volume	0.1	6.0	10.0 [ml]

Waste position:

Solvent waste
 Aqueous waste

Solvents:

Metanol
 Agua Ultra Pura
 Solvent 3
 Met Acet 3 2
 Solvent 5

Estimated time 2h : 60min

No.	Method
1	Process 6 Samples using the following method steps:
2	Condition Column with 6.0 ml of Solvent 3 into solvent waste
3	Condition Column with 6.0 ml of Metanol into solvent waste
4	Condition Column with 3.0 ml of Agua Ultra Pura into aqueous waste
5	Load 2000.0 ml of sample onto Column
6	Rinse Column with 1.0 ml of Agua Ultra Pura into aqueous waste
7	Dry Column with gas for 40.0 minutes
8	Collect 2.0 ml Fraction into sample tube using Solvent 3
9	Collect 4.0 ml Fraction into sample tube using Solvent 3
10	End

Figura 8.14: Condições de operação do equipamento de SPE. Solvent 3 = diclorometano.

Avaliou-se o uso de 3 cartuchos de SPE de 6 ml: o cartucho Oasis HLB 200 mg, o cartucho Chromabond HR-P 500 mg e o cartucho Isolute C18 (EC) 1 g.

- Limpeza do extrato

Este passo foi necessário devido a existirem muitos interferentes em algumas matrizes, tendo-se recorrido a um filtro descrito noutra trabalho^{[32][33]} para esta limpeza.

Este filtro é constituído por 3 g de florisil, 2,5 g de cobre em pó e 1 g de sulfato de sódio anidro, colocados conforme a Figura 8.15.



Figura 8.15: Filtro de limpeza do extrato de SPE.

O procedimento de filtração foi o seguinte:

- 1 – Passar 10 ml de diclorometano, sendo este descartado;
- 2 – Passar a amostra, e recolher o filtrado;
- 3 – Passar 10 ml de diclorometano, e recolher o filtrado, junto com o da amostra.

O método de limpeza descrito foi aplicado nas matrizes de água superficial e água subterrânea, não sendo aplicado na matriz água para consumo humano.

8.7.2.2 *Extração líquido-líquido (LLE)*

Este método de preparação de amostra consistiu numa extração dupla do extrato, de acordo com o procedimento seguinte.

- 1 – Lavou-se a ampola de extração com 20 ml de diclorometano, sendo este diclorometano descartado;
- 2 – Colocou-se 2 l de amostra na ampola de extração, fortificou-se e adicionou-se 20 ml de diclorometano;
- 3 – Agitou-se durante 10 minutos;
- 4 – Decantou-se a fase apolar (inferior) para um funil contendo sulfato de sódio anidro;
- 5 – Repetir os passos 2 a 4, uma segunda vez, sendo o extrato obtido adicionado ao extrato da primeira extração.

8.7.2.3 *Concentração e troca de solvente*

O último passo da preparação da amostra para ambos os métodos de extração foi constituído pela troca de solvente e a concentração do extrato para um volume de 0,5 ml.

Condições do *turbovap*:

- Fluxo da corrente de azoto: 0,3 bar;
- Temperatura do banho termostaticado: 35 °C.

O processo de troca de solvente e concentração consistiu em:

- 1 – Concentrar o extrato até um volume ligeiramente inferior a 0,5 ml;
- 2 – Adicionar 2 ml de acetona e agitar manualmente;
- 3 – Concentrar o extrato até um volume ligeiramente inferior a 0,5 ml;
- 4 – Aferir o volume a 0,5 ml com acetona.

9 Tratamento e discussão de resultados

A validação de um método analítico envolve sempre o desenvolvimento do método, com a otimização das condições de operação e o estudo e conhecimento de parâmetros analíticos que o possam avaliar tais como a seletividade/especificidade, gama de linearidade, sensibilidade, precisão e exatidão.

A técnica de UPLC-MS/MS foi a técnica inicial do trabalho tendo sido aplicada à grande maioria dos pesticidas. A validação do método analítico para esta técnica não foi iniciada com um único conjunto de pesticidas, no entanto esta validação será apresentada como se fosse um único grupo de forma a facilitar a exposição da mesma, sendo alguns pesticidas destacados quando pertinente.

Durante o estudo de validação da curva de calibração vários pesticidas foram excluídos da técnica de UPLC-MS/MS, tendo sido transferidos para o grupo de pesticidas a validar pelo método de GC. A razão deste procedimento será abordada no passo da validação que levou à sua exclusão.

A técnica de GC utilizada foi GC-ECD, tendo-se avaliado previamente as técnicas de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) e cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa de captura de iões (GC-ITMS). Estas duas técnicas não foram muito exploradas devido a uma avaria do equipamento de GC-ITMS e ao facto do equipamento de GC-MS ter apresentado menor sensibilidade que o GC-ECD. No entanto, antes da avaria do equipamento de GC-ITMS foi possível otimizar as condições de aquisição de dados no modo *Selected Ion Storage* (SIS) para alguns pesticidas, tendo-se verificado que este apresentava a melhor sensibilidade dos 3 detetores. O modo SIS deste equipamento é análogo ao modo *Selected Ion Monitoring* (SIM) de um espectrómetro de massa de quadrupolo.

As técnicas de GC-MS e GC-ITMS não serão abordadas ao longo desta exposição, estando apenas referenciadas aqui como justificação da utilização de GC-ECD como técnica de separação e quantificação. O grupo de pesticidas analisado por esta técnica foi constituído pelos vários pesticidas que foram excluídos da técnica de UPLC-MS/MS por motivos de sensibilidade ou linearidade, sendo desde o início do trabalho um único grupo.

9.1 UPLC-ESI-MS/MS

9.1.1 Otimização das condições de MRM

De forma a se poder utilizar o modo de *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) para quantificação, foi necessário escolher duas transições ião precursor - ião produto a monitorizar, bem como otimizar três parâmetros do espectrómetro de massa para definir estas transições. Foram estes, a tensão do capilar, a voltagem de cone e a energia de colisão.

Existem duas formas de executar esta otimização quando se trabalha com equipamentos de LC-MS/MS, sendo estas por infusão ou injeção de padrões. O método mais usual é o método de infusão, pois este é mais prático e rápido de executar do que o método de injeção.

9.1.1.1 Otimização pela técnica de Infusão direta no equipamento de MS/MS

Esta técnica de otimização dos parâmetros de MRM recorre à introdução da amostra diretamente no espectrómetro de massas com um fluxo de 10 µl/min.

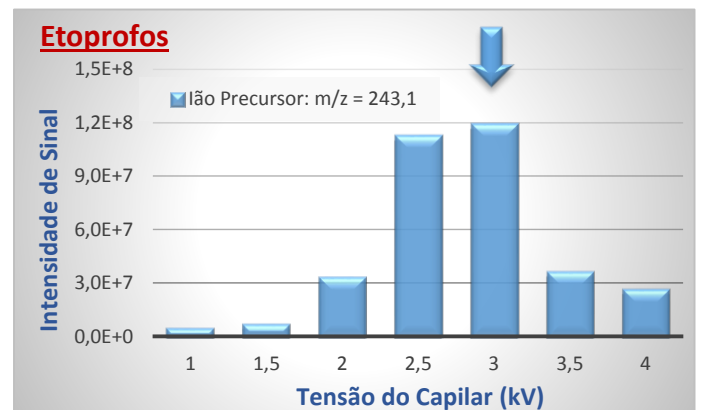
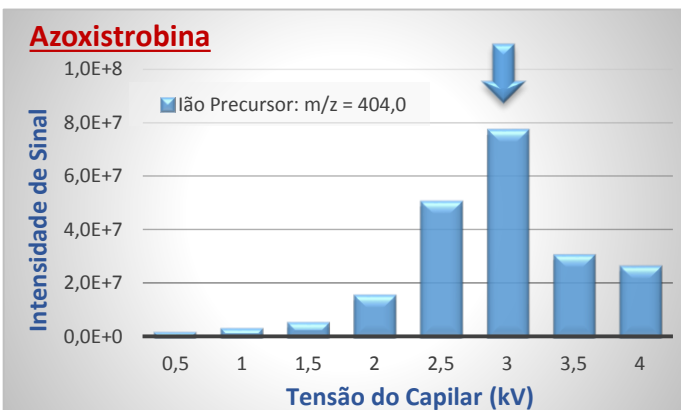
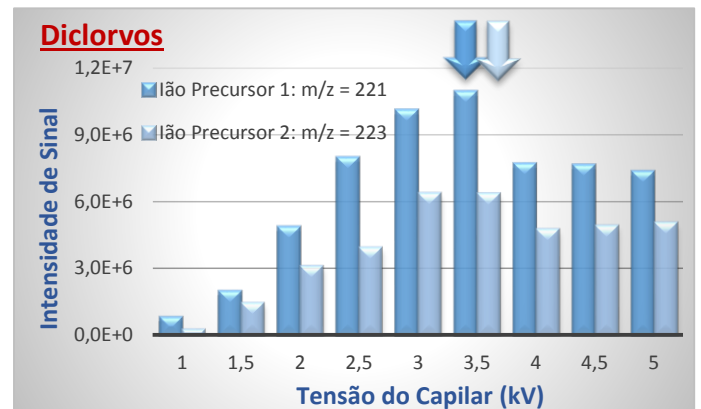
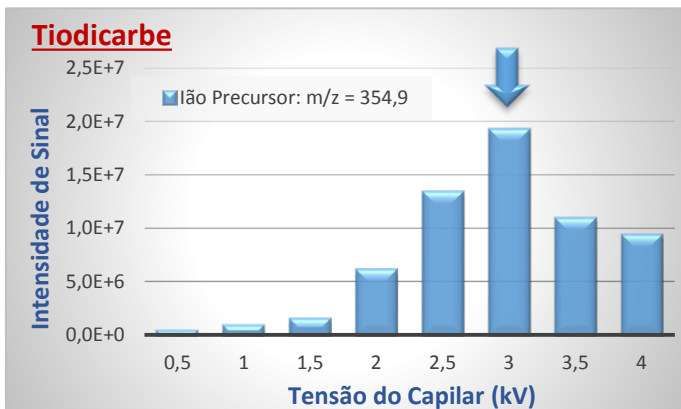
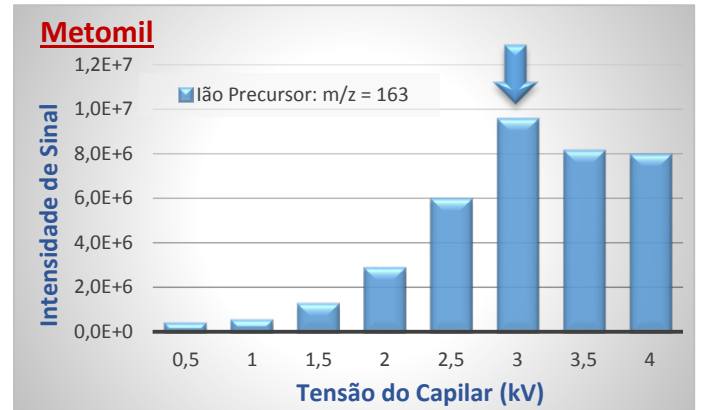
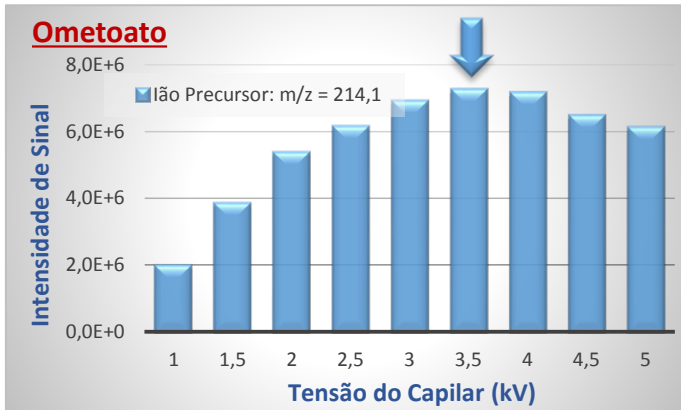
Esta otimização foi feita com recurso ao programa de controlo do espectrómetro de massas que está representado na Figura 8.5. Os parâmetros otimizados foram a tensão do capilar, a voltagem de cone, e a energia de colisão. Para isto foram preparadas soluções individuais de cada pesticida a uma concentração de 0,5 – 1 mg/l usando como solvente água:metanol (9:1) com 5 mM de ácido fórmico.

9.1.1.1.1 Otimização da tensão do capilar

O primeiro passo da otimização dos parâmetros de MRM foi verificar em que modo de ionização o composto ioniza preferencialmente (ESI+ ou ESI-), ou seja, se este tem tendência a criar iões positivos ou negativos. De seguida procedeu-se à otimização da tensão do capilar, através da aquisição de uma série de espectros de massa no modo *full scan*, utilizando uma voltagem de cone próxima de 20 V e variando o valor da tensão do capilar de 0,5 em 0,5 até 3,5 ou 4 kV.

Durante este passo verificou-se que os pesticidas bifenox, deltametrina, e dicofol apresentaram uma extensa fragmentação, pelo que os pesticidas deltametrina e dicofol foram transferidos para o grupo de pesticidas a analisar pelas técnicas de GC, enquanto o pesticida bifenox foi otimizado utilizando o método de injeção de padrões.

Com estes espectros de massa e a informação da massa molecular foi possível identificar o ião pseudo molecular, sendo este seleccionado como ião precursor. Pela representação gráfica (Figura 9.1) da intensidade de sinal vs. tensão do capilar do ião pseudo molecular foi possível verificar que a tensão do capilar que proporcionou a maior intensidade de resposta para todos os pesticidas foi de 3,0 ou 3,5 kV. Na Tabela 9.1 apresenta-se o resumo dos valores da tensão do capilar otimizada para cada pesticida e no Anexo IV os espectros de massa correspondentes à tensão do capilar ótima.



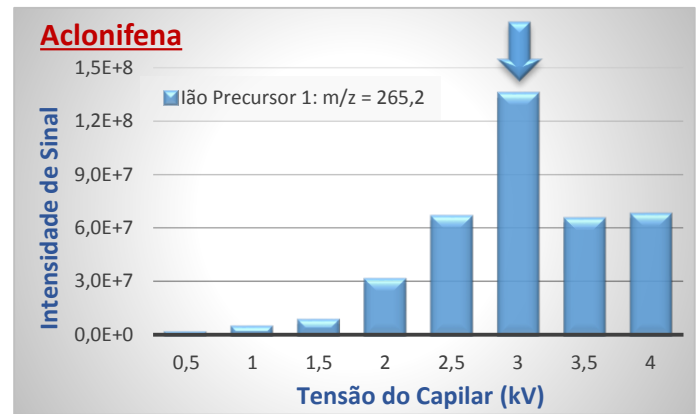
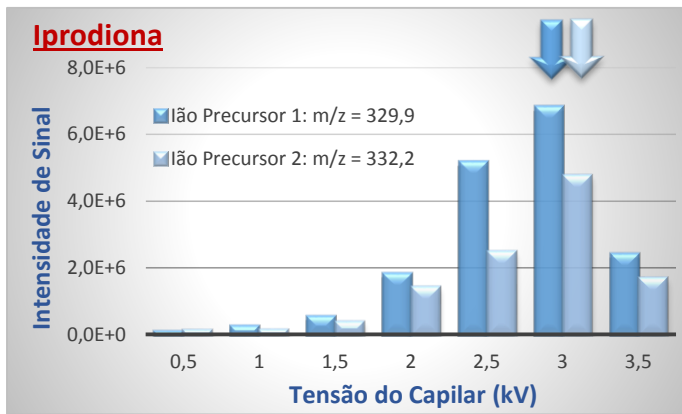
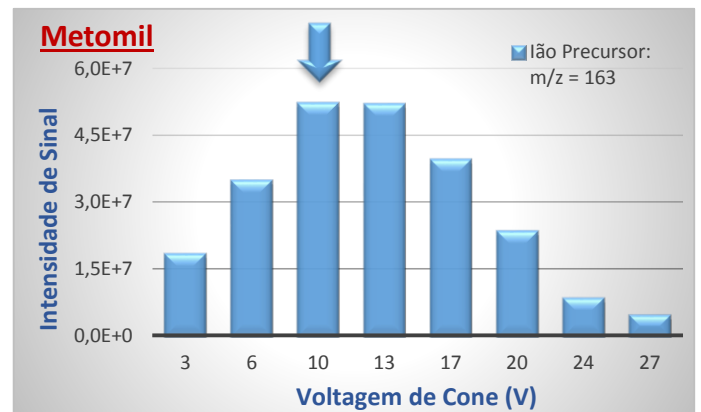
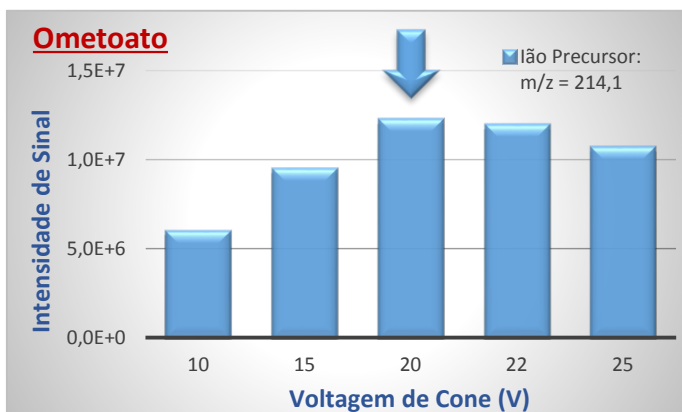


Figura 9.1: Representação gráfica da intensidade de sinal de resposta em função da tensão do capilar (kV) para o íon precursor de cada pesticida.

9.1.1.1.2 Otimização da voltagem de cone

Para a otimização deste parâmetro adquiriram-se vários espectros de massa utilizando o valor otimizado da tensão do capilar, o modo de aquisição de dados de *full scan*, e variando-se o valor da voltagem de cone em pequenos intervalos entre 5 V e um valor suficientemente elevado (50-60 V) para se verificar uma acentuada redução da intensidade.

De forma a visualizar qual o valor da voltagem de cone que proporcionava a maior intensidade de resposta para o íon precursor, representou-se esta em função da voltagem de cone, Figura 9.2. Na Tabela 9.1 apresenta-se o resumo da voltagem de cone otimizada para cada pesticida e no Anexo IV os espectros de massa correspondentes à voltagem de cone ótima.



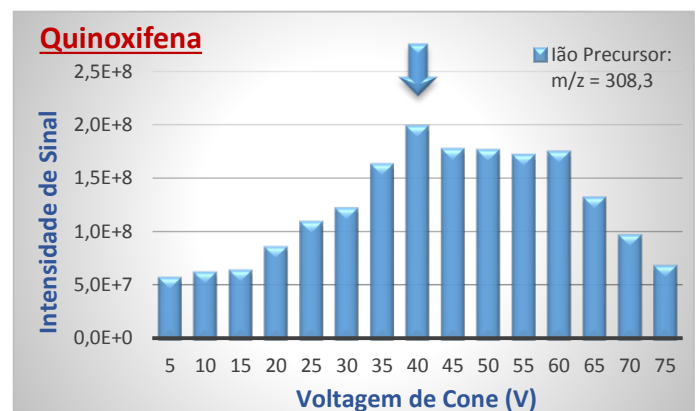
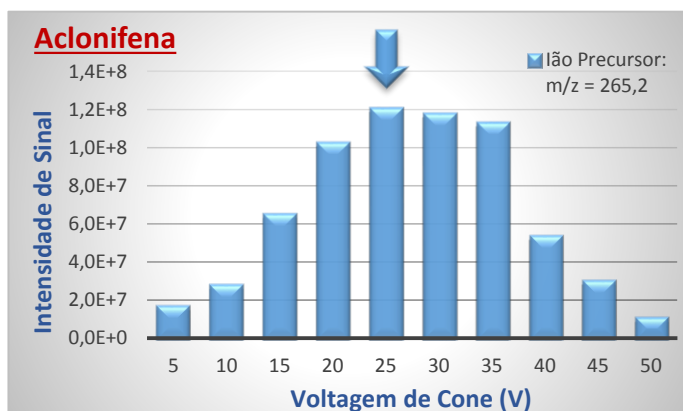
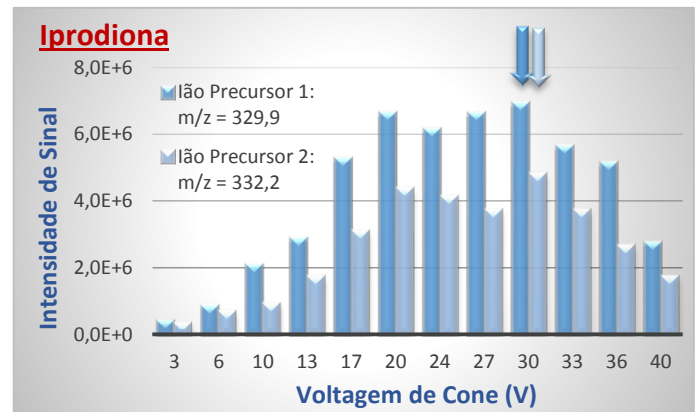
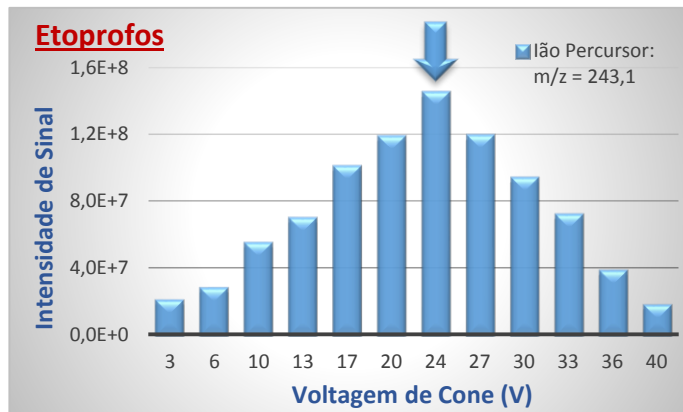
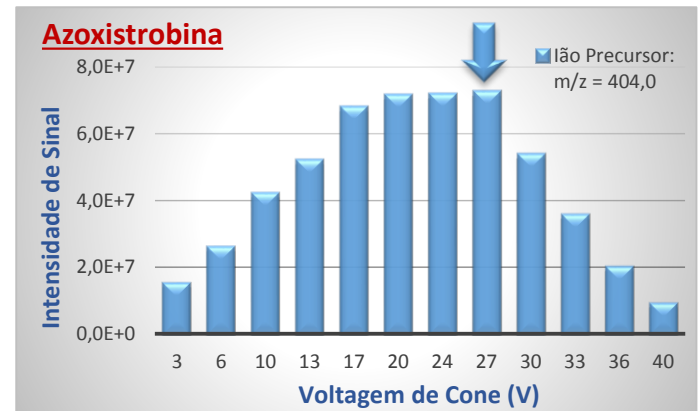
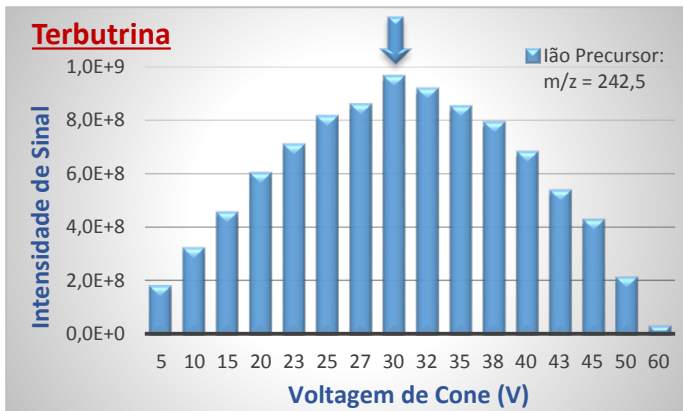
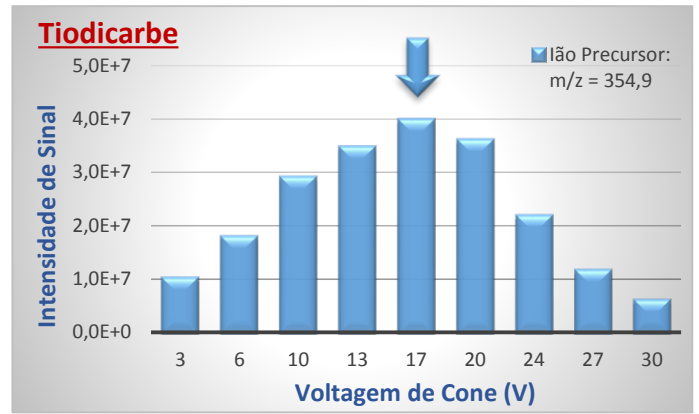
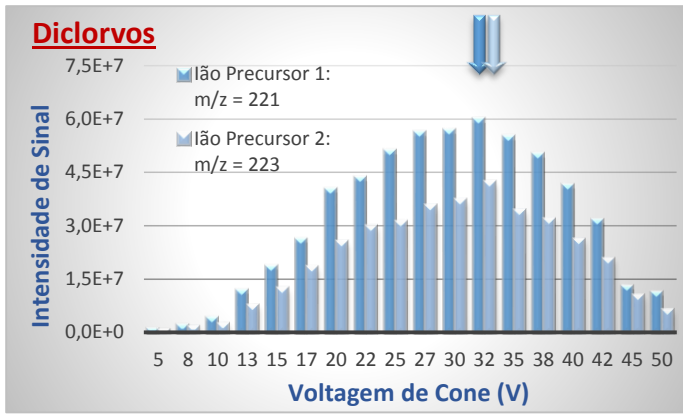


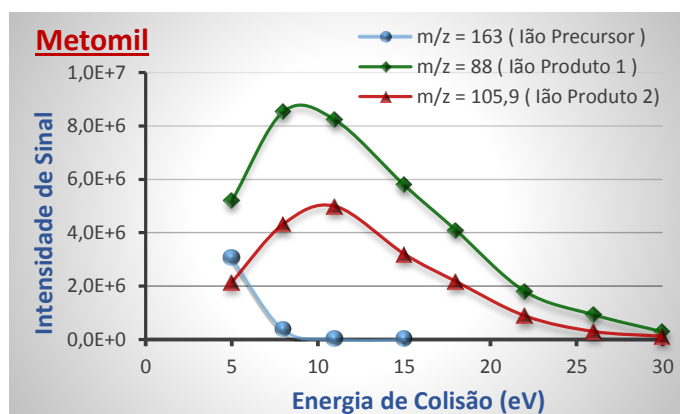
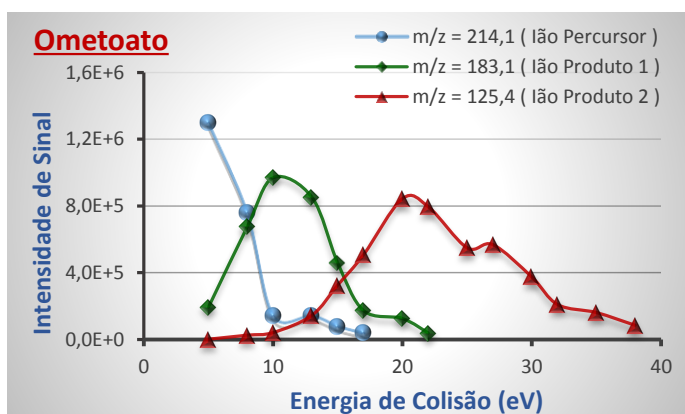
Figura 9.2: Representação gráfica da intensidade de sinal de resposta em função da variação voltagem de cone (V) para o ião precursor de cada pesticida.

9.1.1.1.3 Otimização da energia de colisão

Para a otimização deste parâmetro adquiriram-se vários espectros de massa utilizando as condições anteriormente otimizadas, no modo de aquisição *daughter scan* (*scan* do ião produto), fazendo-se variar o valor da energia de colisão de 5 eV até um valor suficientemente alto para que se observasse um decréscimo significativo na intensidade dos picos dos iões produto candidatos.

Para os pesticidas diclorvos e iprodiona não foi possível obter uma segunda transição adequada ao método MRM do mesmo ião molecular. Devido a ambos os pesticidas possuírem dois átomos de cloro utilizou-se dois iões precursores diferentes, com base na abundância isotópica relativa entre o pesticida contendo dois átomos ^{35}Cl e o pesticida contendo um átomo ^{35}Cl e outro ^{37}Cl .

De forma a observar a evolução da fragmentação do ião precursor e iões produto candidatos representou-se graficamente a intensidade de resposta para estes e para o ião precursor em função da energia de colisão, Figura 9.3. Foram escolhidos os 2 iões mais intensos para o método de MRM, tendo sido selecionada a transição mais intensa como a transição de quantificação para todos os pesticidas. Na Tabela 9.1, apresenta-se o resumo da energia de colisão otimizada para cada transição de MRM, bem como a informação de qual é a transição MRM de quantificação e confirmação, estando no Anexo IV os espectros de massa correspondentes ao *Daughter Scan* da energia de colisão ótima.



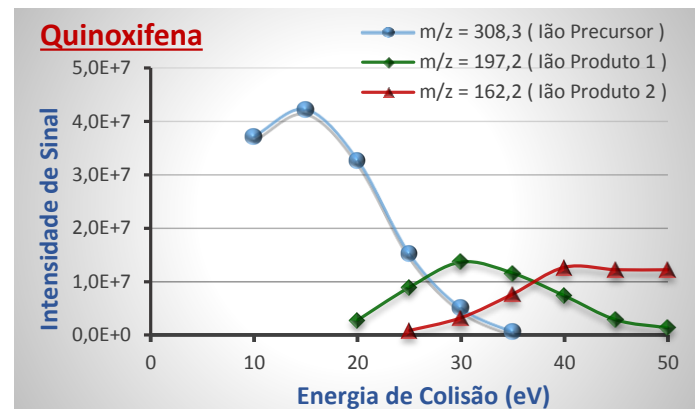
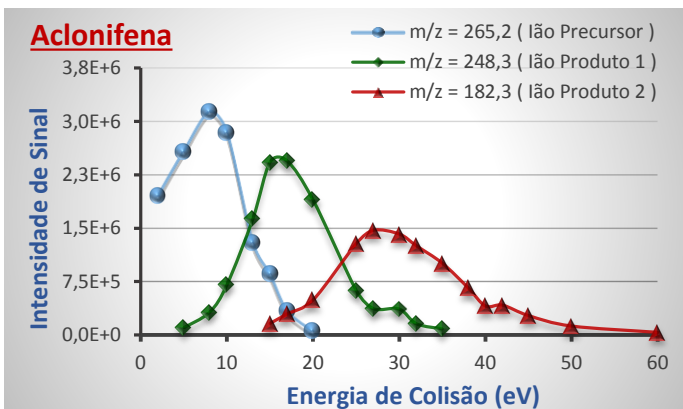
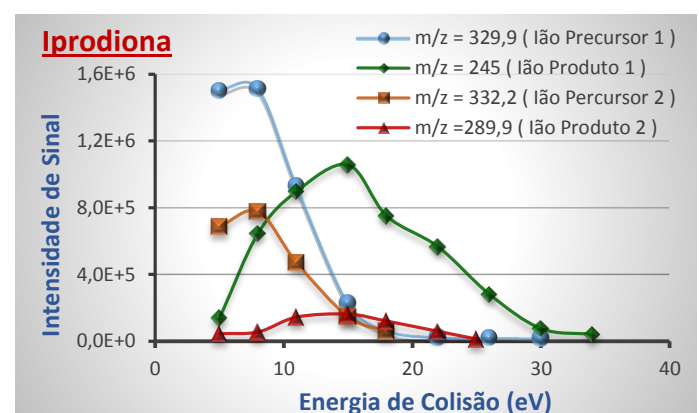
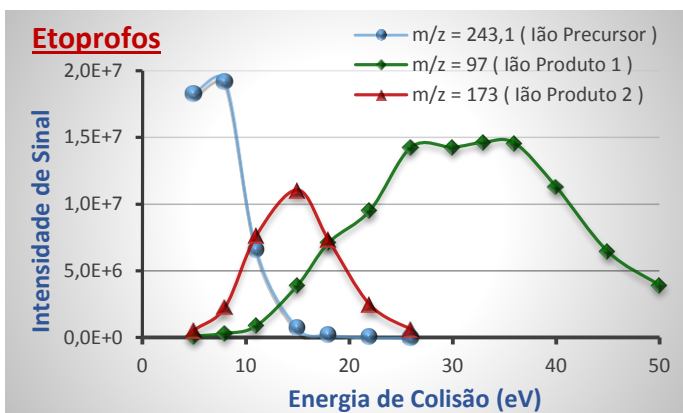
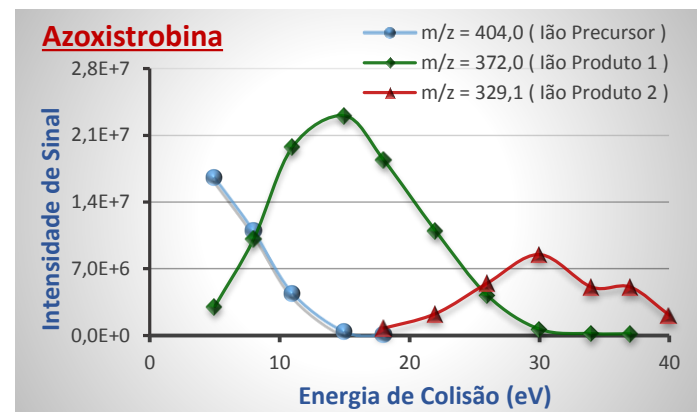
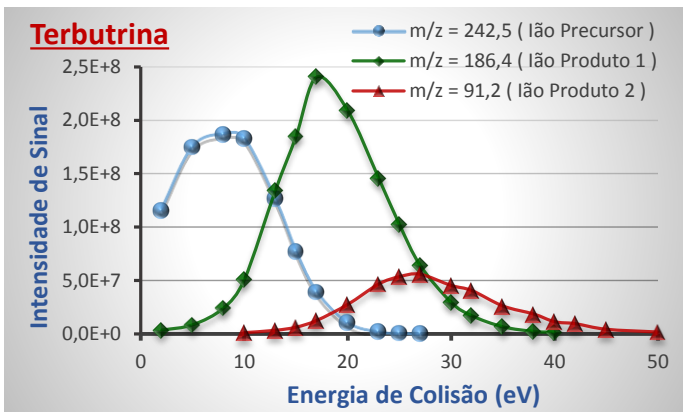
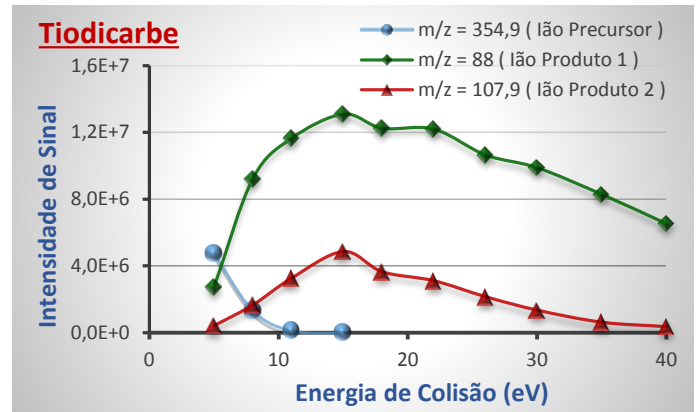
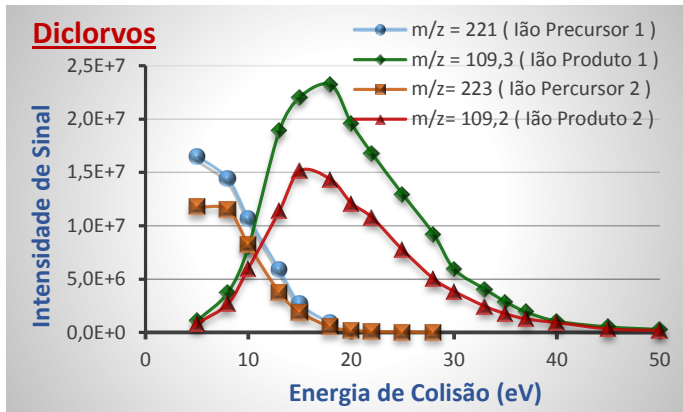


Figura 9.3: Representação gráfica da intensidade de sinal de resposta com a variação da energia de colisão para os iões precursor e produto selecionados para as transições MRM1 e MRM2.

9.1.1.2 *Otimização por injeção no UPLC-MS/MS*

Este método de otimização das condições de MRM foi utilizado apenas para o pesticida Bifenox numa tentativa de otimizar as condições de MRM. O método consiste em executar uma injeção no UPLC-MS/MS, recorrendo-se aos modos de *full scan*, SIR e *daughter Scan* disponíveis no programa de controlo do equipamento de UPLC-MS/MS registando os cromatogramas e espectros de massa.

Inicialmente fez-se uma injeção no UPLC-MS/MS no modo de *full scan*, tendo-se analisado os espectros de massa correspondentes aos picos cromatográficos para identificar o ião molecular. Com este ião molecular executou-se a otimização da voltagem de cone com o modo de aquisição de dados SIR, sendo por fim otimizada a energia de colisão com o modo *daughter scan*.

À semelhança dos pesticidas diclorvos e iprodiona não foi possível obter uma segunda transição adequada para o modo MRM para o bifenox, tendo-se também utilizado a abundância isotópica do cloro para adquirir a segunda transição MRM.

Neste caso não se procedeu à otimização da tensão do capilar, tendo-se utilizado o valor de tensão do capilar de 0,5 kV.

9.1.1.3 *Resumo dos parâmetros otimizados de MRM*

Os parâmetros de MRM otimizados para cada pesticida encontram-se resumidos na Tabela 9.1, juntamente com a informação da transição a que correspondem e também se se trata da transição de quantificação ou de confirmação.

Embora os valores otimizados para infusão sejam os apresentados na Tabela 9.1, quando se executaram injeções no UPLC-MS/MS, o valor da tensão do capilar utilizado foi de 0,5 kV, devido a se ter verificado que este proporciona uma maior intensidade de resposta para a maioria dos pesticidas quando se executa uma injeção no UPLC-MS/MS. Este facto deve-se possivelmente à quantidade de amostra que chega à fonte de ionização, uma vez que o fluxo utilizado na infusão é de 10 µl/min enquanto na injeção no UPLC-MS/MS é de 0,3 ml/min, o que altera a tensão ótima do capilar para a ionização dos pesticidas.

Tabela 9.1: Resumo das condições otimizadas para as transições de MRM1 e MRM2.

Pesticida	Modo de Ionização	Tensão Capilar (kV)	Ião Precursor	Voltagem de cone (V)	Transição (MRM)	Energia de colisão (eV)	Razão MRM1/MRM2
Ometoato	ESI +	3,5	214,1	20	214,1→183,1	10	1,6
					214,1→125,4	20	Quantificação
Metomil	ESI +	3,0	163,0	10	163,0→88,0	11	2,8
					163,0→105,9	8	Quantificação
Diclorvos	ESI +	3,5	221,0	32	221,0→109,3	18	1,6
					223,0→109,2	15	Quantificação
Tiodicarbe	ESI +	3,0	354,9	17	354,9→88,0	15	4,3
					354,9→107,9	Quantificação	
Terbutrina	ESI +	-	242,5	30	242,5→186,4	17	4,3
					242,5→91,2	27	Quantificação
Azoxistrobina	ESI +	3,0	404,0	27	404,0→372,0	15	2,8
					404,0→329,1	30	Quantificação
Etoprofos	ESI +	3,0	243,1	24	243,1→97,0	33	1,1
					243,1→173,0	15	Quantificação
Iprodiona	ESI +	3,0	329,9	30	329,9→245,0	15	2,8
					332,2→247,1	Quantificação	
Aclonifena	ESI +	3,0	265,2	25	265,2→248,3	17	2,3
					265,2→182,3	27	Quantificação
Bifenox	ESI +	-	342,1	25	342,1→310,1	8	3,7
					344,3→312,1	Quantificação	
Quinoxifena	ESI +	-	308,3	40	308,3→197,2	30	1,2
					308,3→162,2	40	Quantificação

9.1.2 Gradiente da fase móvel

O gradiente de concentrações utilizado encontra-se apresentado na Figura 8.2. O tempo total da corrida cromatográfica é de 8,00 minutos, sendo que o gradiente de 7,20 a 8,50 minutos tem a função de reequilibrar a coluna cromatográfica para a injeção seguinte. O gradiente que começa a 9,00 minutos, é o gradiente residual de preservação da coluna, sendo aplicado no fim da sequência de injeções cromatográficas.

Os tempos de retenção verificados para cada pesticida podem-se observar nos correspondentes cromatogramas individuais típicos para a transição de quantificação (MRM1) apresentados na Figura 9.4.

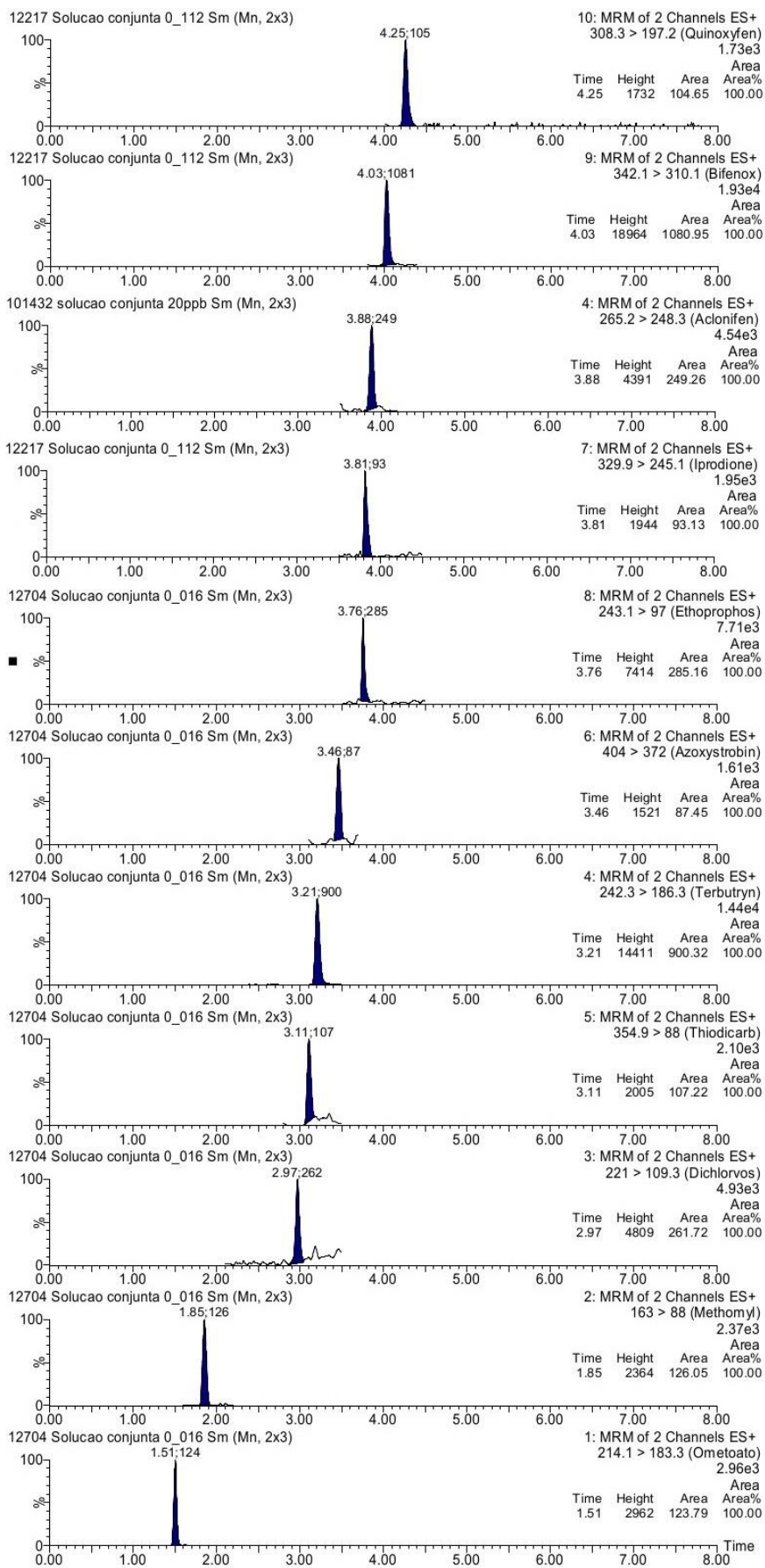


Figura 9.4: Cromatograma individual típico para a transição de quantificação (MRM1) dos vários pesticidas.

9.1.3 Validação da curva de calibração

A validação do método de UPLC-MS/MS foi inicialmente executada utilizando água ultrapura como solvente, passando-se posteriormente à mistura água:metanol (9:1), com 0,1 mM de acetato de amónio. Tendo-se utilizado a gama de concentrações inicial para a validação de $\cong 0,016$ a $0,4 \mu\text{g/l}$ ou de $\cong 4$ a $100 \mu\text{l}$ para os pesticidas aclonifena, bifenoX e iprodiona, devido à diferença de intensidade de resposta verificada durante a otimização das condições de aquisição de dados MRM.

9.1.3.1 Testes de linearidade iniciais e estabilidade

Inicialmente utilizou-se como critério de linearidade o método dos mínimos quadrados sob a forma do coeficiente de regressão linear (Anexo V), que tinha de ser superior a 0,995, a análise de resíduos (Anexo VI), que teria de ser inferior a $\pm 15\%$ para todos os padrões da gama de linearidade, e a estabilidade entre as transições MRM1 e MRM2 ou razão de confirmação, RC (Anexo VII) onde o coeficiente de variação teve de ser inferior a 15% .

Para os pesticidas aclonifena, iprodiona e quinoxifena observou-se que não existia linearidade para as curvas de calibração preparadas em ambos os solventes, dado que o coeficiente de correlação obtido foi inferior a 0,995. Assim não foi executado mais nenhum tratamento estatístico com vista à validação destes para a técnica de UPLC-MS/MS, sendo transferidos para o grupo de pesticidas a analisar pelas técnicas de GC.

Para os restantes pesticidas verificou-se a existência de linearidade e o coeficiente de correlação linear não sofria grande alteração entre as curvas de calibração preparadas em ambos os solventes. No entanto, ao preparar a curva de calibração com o solvente água:metanol (9:1), com 0,1 mM de acetato de amónio, foi possível obter uma gama de linearidade a começar num padrão de concentração inferior para alguns pesticidas. De forma semelhante a razão de confirmação não sofreu alteração significativa para a gama de linearidade encontrada para ambos os solventes.

Na Figura 9.5 apresenta-se a curva de calibração, bem como a razão de confirmação para o pesticida etoprofos para ilustrar a boa linearidade e estabilidade da razão de confirmação obtida para as curvas de calibração preparadas em ambos os solventes, bem como o início da gama de linearidade a uma concentração inferior no caso da curva de calibração preparada em água:metanol (9:1), com 0,1 mM de acetato de amónio. A representação gráfica das restantes curvas de calibração apresenta-se no Anexo VII, juntamente com a representação gráfica da razão de confirmação ao longo da concentração.

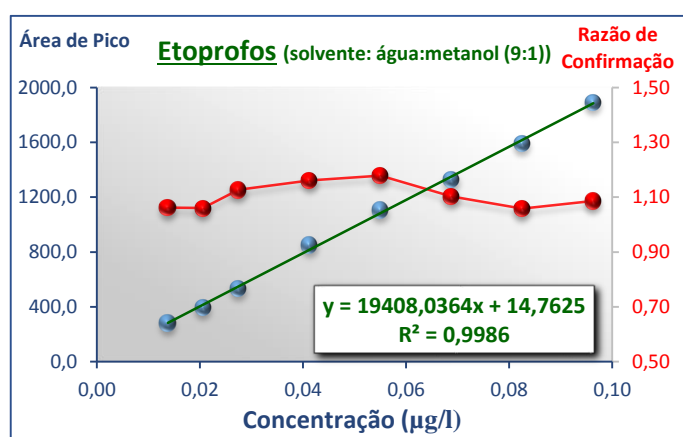
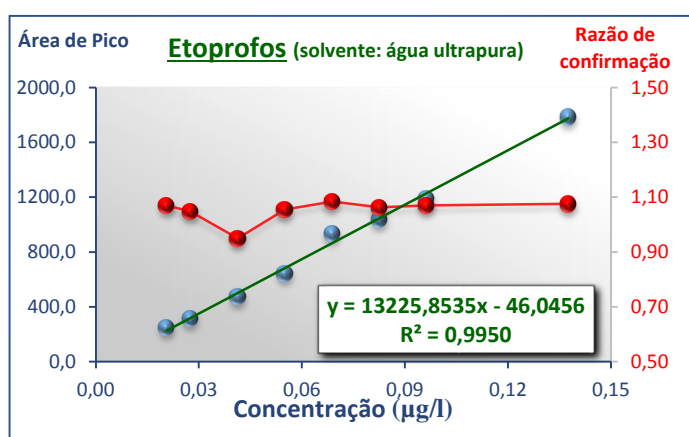


Figura 9.5: Representação da curva de calibração (azul) e da razão de confirmação (vermelho) para o pesticida etoprofos. Solvente: água (esquerda) e água:metanol (9:1), com 0,1 mM de acetato de amónio (direita).

Relativamente ao teste de resíduos, não existe uma alteração significativa entre as curvas preparadas em ambos os solventes, como se pode observar na Figura 9.6, para o pesticida etoprofos, estando a representação gráfica do teste de resíduos para os restantes pesticidas no Anexo VI.

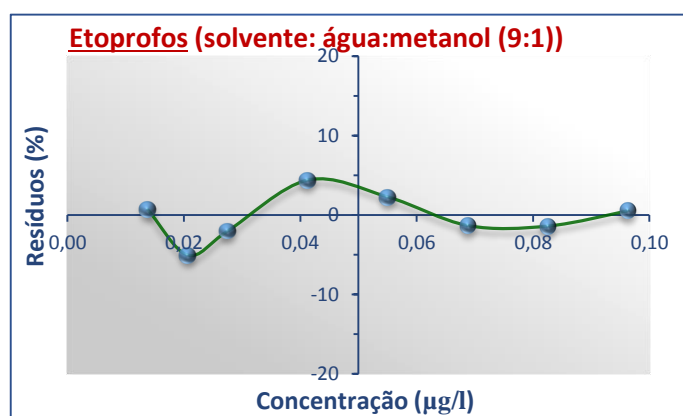
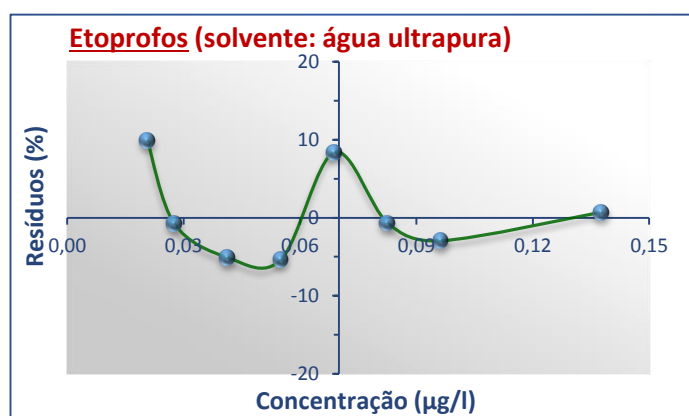


Figura 9.6: Representação do resultado da análise de resíduos para o pesticida etoprofos. Solvente: água ultrapura (esquerda), água:metanol (9:1), com 0,1 mM de acetato de amónio (direita).

Apresentam-se as Tabela 9.2 e 9.3 como resumo destes resultados de forma a melhor evidenciar a variação entre os resultados obtidos. No entanto, como o objetivo requeria atingir um limite de quantificação o mais baixo possível para os vários pesticidas,

decidiu-se utilizar como solvente a mistura de água:metanol (9:1), com 0,1 mM de acetato de amónio devido a este proporcionar as curvas de calibração com o limite da gama de trabalho mais baixo, não se tendo procedido a mais testes para a curva de calibração preparada em água ultrapura.

Tabela 9.2: Validação da gama de linearidade para os pesticidas (solvente: água ultrapura).

Pesticidas	Gama de linearidade (µg/l)	Nº Padrões de Calibração	R ²	Equação da Curva		Teste de Resíduos (%)	Razão de confirmação	
				a	b		Média	Desvio Padrão CV (%)
Ometoato	0,015 – 0,10	8	0,9986	8,2263	8625,2	[-5,4; 4,5]	1,6	0,047 2,9
Metomil	0,016 – 0,11	8	0,9982	4,3007	9401,6	[-3,1; 9,4]	2,8	0,30 11
Diclorvos	0,016 – 0,11	8	0,9996	58,107	18053	[-3,3; 4,4]	1,6	0,14 8,7
Tiodicarbe	0,016 – 0,11	8	0,9961	-3,7424	4732,6	[-5,8; 4,5]	3,9	0,51 13,
Terbutrina	0,027 – 0,13	7	0,9967	-205,98	26765	[-7,1; 8,2]	4,2	0,30 7,2
Azoxistrobina	0,024 – 0,11	7	0,9959	-4,9367	4640,7	[-3,2; 5,5]	3,7	0,44 12
Etoprofos	0,021 – 0,14	8	0,9950	-46,046	13226	[-2,9; 9,9]	1,1	0,043 4,1
Bifenox	24 – 100	6	0,9992	1,7833	22,256	[-5,1; 3,3]	3,8	0,49 13

*Equação da curva de calibração: $y = a + bx$.

Tabela 9.3: Validação da gama de linearidade para os pesticidas (solvente: água:metanol (9:1), com 0,1 mM de acetato de amônio).

Pesticidas	Gama de linearidade (µg/l)	Nº Padrões de Calibração	R ²	Equação da Curva		Teste de Resíduos (%)	Razão de confirmação		
				a	b		Média	Desvio Padrão	CV (%)
Ometoato	0,015 – 0,10	8	0,9990	3,3979	8774,7	[-4,5; 3,5]	1,6	0,083	5,1
Metomil	0,016 – 0,11	8	0,9972	1,8106	8398,5	[-7,0; 5,0]	2,8	0,17	6,1
Diclorvos	0,016 – 0,11	8	0,9979	25,690	14721	[-5,2; 5,5]	1,6	0,090	6,3
Tiodicarbe	0,016 – 0,11	8	0,9975	-11,748	8732,9	[-8,6; 7,5]	4,5	0,64	15
Terbutrina	0,018 – 0,11	7	0,9996	29,417	48316	[-1,4; 1,0]	4,3	0,18	4,2
Azoxistrobina	0,016 – 0,11	8	0,9974	2,5261	7577,7	[-8,2; 2,7]	2,8	0,31	11
Etoprofos	0,014 – 0,096	8	0,9986	14,763	19408	[-5,0; 4,4]	1,1	0,047	4,3
Bifenox	12 – 100	9	0,9999	3,0881	36,098	[-2,5; 1,7]	3,7	0,55	15

*Equação da curva de calibração: $y = a + bx$.

9.1.3.2 Testes de Mandel, Rikilt, Áreas normalizadas e Homogeneidade de variâncias.

Estes testes foram aplicados com a finalidade de reforçar a validação da gama de trabalho e para dar cumprimento à norma ISO 8466-1, estando o resultado da aplicação destes na Tabela 9.4 e Figura 9.7, encontrando-se a sua aplicação nos Anexos VIII a XI.

Para o teste de Mandel verificou-se que o valor teste (VT) para todos os pesticidas é inferior ao valor de F da distribuição de Fisher-Snedecor, o que revela que as gamas de linearidade estão bem definidas. Com o teste da homogeneidade de variâncias, verificou-se que apenas o pesticida ometoato possuía homogeneidade de variâncias ao longo da sua gama de trabalho. No entanto devido à gama de trabalho já ser estreita não se considerou necessário reduzir-se ainda mais.

Para os testes de Rikilt e Áreas normalizadas que avaliam a tendência da dispersão dos pontos experimentais, verificou-se que a dispersão dos pontos experimentais encontrou-se dentro dos limites de dispersão admitidos para estes testes e de que a dispersão destes era aleatória. Na Figura 9.7 apresenta-se a representação gráfica do resultado da aplicação destes testes para o pesticida etoprofos, estando a representação para os restantes pesticidas no Anexo IX e X.

Tabela 9.4: Resultados da aplicação dos testes de Mandel, Rikilt, Áreas normalizadas e homogeneidade de variâncias.

Pesticidas	Teste de Mandel		Homogeneidade de variâncias		Teste de Rikilt (%)	Teste das áreas normalizadas (%)
	F _{95%} (N-3)	VT	F _{99,0%}	PG		
Ometoato	6,61	0,45	4,46	4,40	[96; 104]	[96; 104]
Metomil	6,61	0,30	4,46	5,93	[94; 105]	[96; 107]
Diclorvos	6,61	0,64	4,46	8,79	[93; 105]	[99; 111]
Tiodicarbe	6,61	0,34	4,46	19,4	[92; 105]	[94; 108]
Terbutrina	7,71	0,06	4,85	12,2	[98; 102]	[100; 104]
Azoxistrobina	6,61	4,49	4,85	7,25	[94; 103]	[99; 108]
Etoprofos	6,61	0,35	4,46	8,31	[97; 104]	[95; 103]
Bifenox	5,99	0,94	4,46	28,6	[98; 102]	[98; 102]

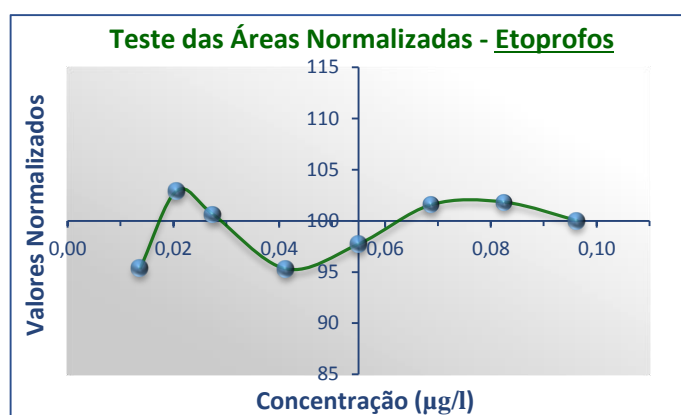
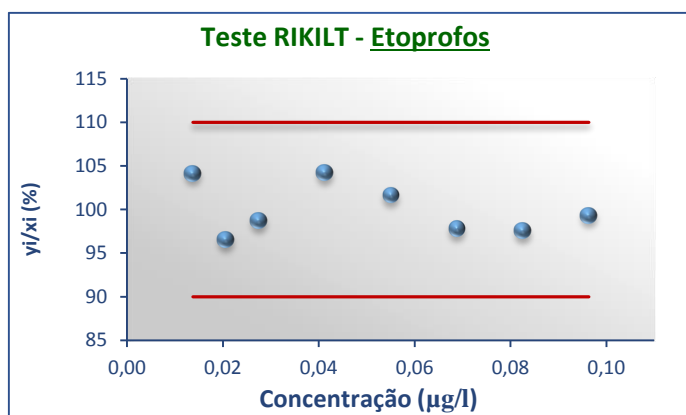


Figura 9.7: Representação do resultado dos testes de Rikilt (esquerda) e áreas normalizadas (direita) para o pesticida etoprofos.

9.1.3.3 Precisão

A precisão ou repetibilidade da gama de trabalho foi avaliada pela análise sucessiva de padrões de controlo correspondentes aos extremos da gama de linearidade e a pelo menos um ponto intermédio para a maioria dos pesticidas. Para a averiguação desta recorreu-se ao cálculo do coeficiente de variação das transições MRM1, MRM2 e da razão de confirmação RC (Anexo IV).

Com este estudo verificou-se que a repetibilidade era significativamente melhor para a concentração correspondente ao limite superior da gama de trabalho do que do limite inferior. Isto deve-se a que as concentrações mais elevadas são menos sensíveis a pequenas variações que podem acontecer no equipamento, mesmo entre análises sucessivas.

Como se pode verificar pela Tabela 9.5 o coeficiente de variação da transição MRM1 obtido foi inferior a 15 % para todos os pesticidas. Já para a transição MRM2 e para a RC o valor do coeficiente de variação foi superior a 15 % para os pesticidas azoxistrobina e bifenox. No entanto, mesmo sendo superior a 15 %, o valor foi aceite devido ao baixo coeficiente de variação da transição MRM1, uma vez que um elevado coeficiente de variação para a transição MRM2 ou RC representa um grau de confiança menor na identificação de um composto, mas não interfere com a quantificação do mesmo.

Tabela 9.5: Coeficiente de variação para a transição MRM1, MRM2 e RC para o ensaio de repetibilidade (n = 10-12) do padrão de calibração mais baixo da curva de calibração.

Pesticidas	CV (%)		
	MRM1	MRM2	RC
Ometoato	3,52	4,52	4,33
Metomil	9,31	12,7	13,9
Diclorvos	7,96	10,5	13,8
Tiodicarbe	9,44	14,3	14,5
Terbutrina	5,81	10,5	7,95
Azoxistrobina	9,28	15,5	16,9
Etoprofos	3,96	9,10	9,42
Bifenox	6,19	20,9	19,4

9.1.3.4 Limiares analíticos

Os limiares analíticos foram determinados com recurso à análise sucessiva de padrões correspondentes ao padrão do limite inferior da gama de trabalho, tendo-se procedido aos cálculos de acordo com o Anexo XII.

Como resultado desta análise poderia ter sido necessário ajustar a gama de trabalho, pois o padrão mais baixo da gama de trabalho deve ser superior ao limite de quantificação (LOQ). Na Tabela 9.6 apresenta-se o resumo desta avaliação, sendo possível constatar de que $LOQ \leq$ limite inferior da gama de linearidade para todos os pesticidas.

Tabela 9.6: Avaliação dos limiares analíticos.

Pesticidas	Limite inferior da gama de Linearidade ($\mu\text{g/l}$)	LOD ($\mu\text{g/l}$)	LOQ ($\mu\text{g/l}$)	CV (%)	Erro relativo (%)
Ometoato	0,015	0,0034	0,011	7,2	8,0
Metomil	0,016	0,0048	0,016	8,8	13
Diclorvos	0,016	0,0032	0,011	7,4	-6,8
Tiodicarbe	0,016	0,0043	0,014	8,7	5,9
Terbutrina	0,018	0,0025	0,0082	4,6	-0,026
Azoxistrobina	0,016	0,0035	0,012	7,1	3,0
Etoprofos	0,014	0,0015	0,0051	4,2	-12
Bifenox	12	2,2	7,4	6,2	-1,3

9.1.4 Ensaios de recuperação

Os ensaios de recuperação são uma parte fundamental da validação de um método, pois muitas vezes é necessário submeter a amostra a algum processo antes da sua análise, seja este um passo de concentração da amostra, ou simplesmente a sua filtração. Todos estes passos podem contribuir com perdas de analito, o que possibilita que exista uma diferença significativa entre o analito quantificado e o que está na amostra. Para além destas possíveis fontes de perda de analito, existem vários interferentes na amostra que podem alterar de forma positiva ou negativa a resposta do equipamento.

Devido à elevada seletividade e sensibilidade do UPLC-MS/MS para a maioria dos pesticidas foi possível validar uma gama de trabalho cujo limite inferior é inferior ao limite da legislação nacional, o que permitiu explorar métodos de injeção direta, requerendo um menor manuseamento da amostra, reduzindo o custo e o tempo de análise.

No entanto, devido à baixa sensibilidade do pesticida bifenoX, à elevada supressão iónica do pesticida tiodicarbe e a existir uma norma de qualidade ambiental (NQA) mais restrita a nível europeu para o pesticida diclorvos, seria necessário um método de extração e concentração para estes pesticidas. Para este fim, explorou-se o método de SPE para concentrar a amostra até um fator de 4000 vezes, mas devido a não se ter realizado muito trabalho neste método de extração, não serão expostos os resultados obtidos para este.

Uma vez que não seria possível atingir os limites impostos pela legislação nacional e europeia para os pesticidas bifenoX e tiodicarbe, não se continuou a validação para estes, sendo continuada a validação para o pesticida diclorvos, de forma a atingir o limite imposto pela legislação nacional.

9.1.4.1 Método de preparação da amostra

Inicialmente experimentou-se analisar a amostra após a filtração da mesma, o que se fez antes de a fortificar. No entanto, devido a baixas recuperações para a maioria dos pesticidas experimentou-se diluir a amostra no solvente utilizado para preparar a curva de calibração, tornando a composição da amostra mais próxima da composição dos padrões da curva de calibração tentando reduzir o efeito de matriz. Fez-se assim “meio-termo” entre a injeção direta e o método de adição padrão, o que possui a vantagem de permitir analisar várias amostras diferentes em simultâneo, enquanto o método de adição padrão obriga a que se prepare uma curva de calibração para cada amostra.

O método de preparação de amostra por diluição em solvente também permite reduzir a diferença de resposta do detetor que possa existir para uma amostra real e para uma solução padrão de calibração. No entanto este método só é viável se a curva de calibração validada permitir atingir um limite de quantificação que seja inferior ao limite imposto pela legislação em vigor, na mesma proporção do fator de diluição utilizado.

Como se pode observar na Figura 9.8 o método de diluição de amostra em solvente na proporção 1:1 apresenta recuperações muito melhores e mais uniformes para todos os pesticidas, exceto para o pesticida tiodicarbe. Este fenómeno para o pesticida tiodicarbe e o aumento inconsistente que se observou para o pesticida metomil devem-se muito possivelmente à rápida hidrólise do pesticida tiodicarbe em metomil, existindo evidências deste processo na literatura^{[34][35]}, e pela alteração observada para as recuperações para o pesticida metomil, quando se removeu o pesticida tiodicarbe do grupo de trabalho.

9.1.4.2 Estudo da eficiência do processo de filtração da amostra

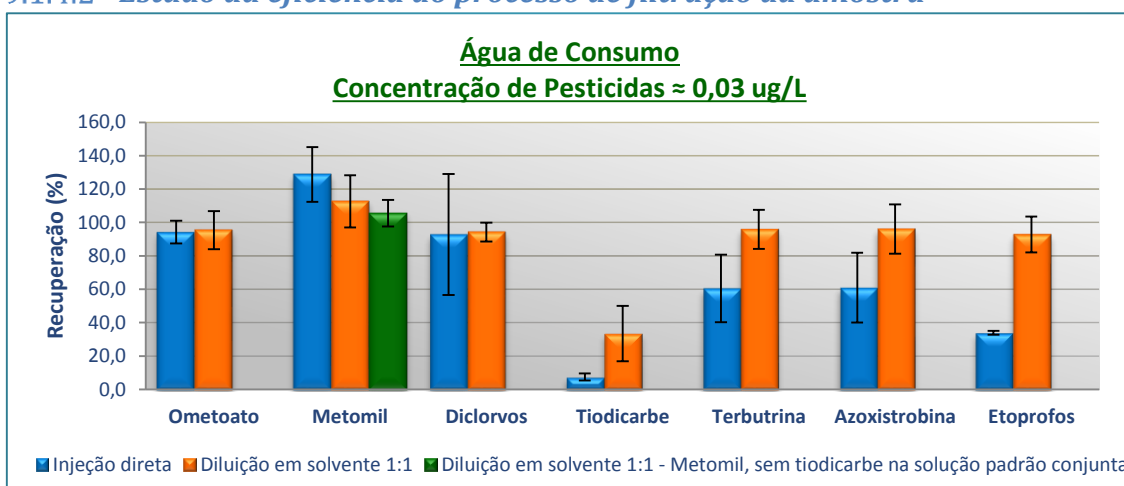


Figura 9.8: Comparação da recuperação obtida para os vários pesticidas pelos 2 métodos de preparação de amostra. Fortificação da matriz: água para consumo humano à concentração real de 0,03 µg/L.

Devido às amostras de água poderem possuir partículas em suspensão e a coluna cromatográfica poder ficar colmatada com estas partículas foi necessário submeter as amostras a um passo de filtração.

Uma vez que o filtro utilizado para remover estas partículas em suspensão também poder reter parte dos analitos, estudou-se a eficiência de vários filtros para este processo.

A avaliação da capacidade de remover partículas em suspensão foi executada pela filtração de uma amostra de captação Tejo por ser normalmente a que apresenta uma maior turvação, sendo a avaliação feita pela aparência do filtrado.

A avaliação da retenção dos analitos foi executada através da análise do padrão P1 filtrado e sem ser filtrado, e por ensaios de recuperação de uma amostra fortificada de água para consumo humano, tendo esta fortificação sido analisada sem ser filtrada, e depois de ser filtrada pelos vários filtros. As fortificações foram preparadas à concentração equivalente ao dobro do padrão de calibração P1, devido ao método de preparação da amostra envolver a sua diluição na proporção de 1:1 no solvente da curva de calibração.

Todas as amostras foram analisadas em duplicado, tendo a média das áreas obtidas para cada ensaio sido normalizada em relação à área média obtida para o padrão de calibração, estando estas representadas na Figura 9.9.

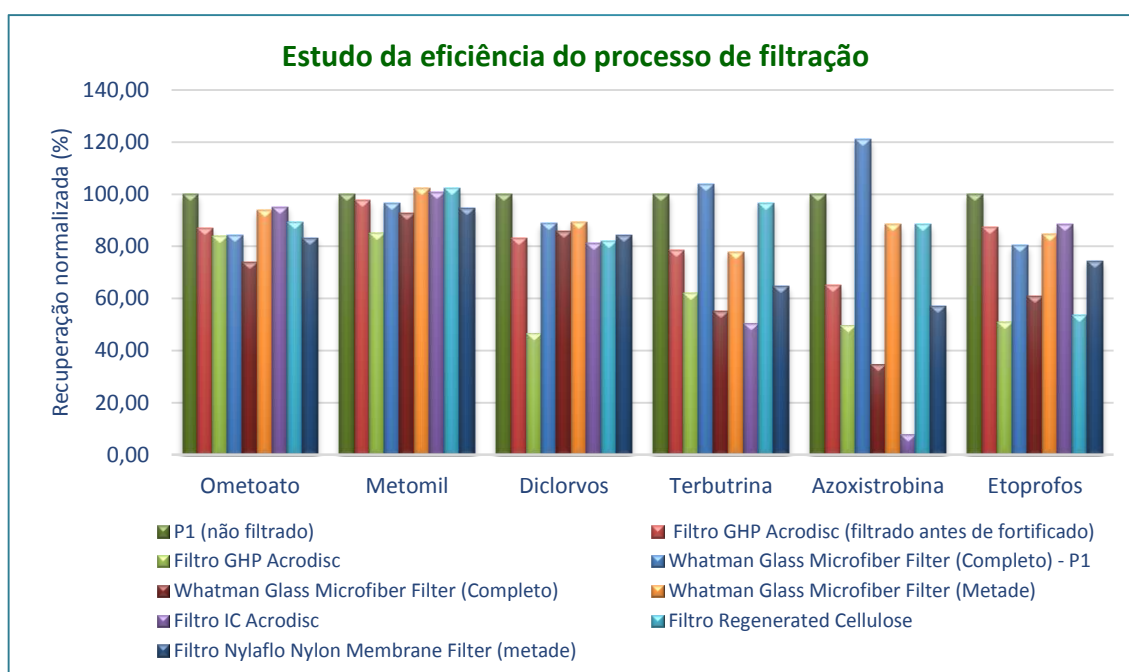


Figura 9.9: Estudo da eficiência do processo de filtração. Amostra: matriz da água para consumo humano, exceto quando se menciona P1, que corresponde à solução padrão de calibração P1.

Como é possível verificar, o processo de filtração interfere com a recuperação, sendo que para os pesticidas ometoato e metomil não existe uma variação significativa, para o diclorvos apenas um dos filtros proporcionou recuperações baixas, sendo que para os restantes pesticidas existiu uma grande variação das recuperações obtidas dependendo do filtro utilizado.

Note-se que a elevada inconsistência para o pesticida azoxistrobina deve-se a este estudo ter sido iniciado após uma sessão de trabalho com a solução padrão intermédia II

preparada com uma antecedência de 20 horas, uma vez que se verificou ao longo do trabalho que este era o pesticida mais instável ao longo do tempo.

Com base nestes dados decidiu-se utilizar metade de um disco do filtro Whatman Glass Microfiber, para o método, pois este foi o único que proporcionou recuperações superiores a 70% para todos os pesticidas e uma limpeza da amostra satisfatória. Estes resultados permitem também considerar como intervalo de aceitação para as recuperações, o intervalo de 70 % – 120 %.

9.1.4.3 *Validação do método de preparação de amostra*

Para a validação do método de preparação de amostra procedeu-se a ensaios de recuperação, sendo estes preparados de acordo com 8.6.1.2 e à concentração de 0,05 µg/l para as matrizes para consumo humano, água superficial e água subterrânea em duas datas diferentes.

Como é possível verificar pela Figura 9.10 e Tabela 9.7 as recuperações são muito boas para praticamente todos os pesticidas, sendo de forma geral próximas de 100 %, exceptuando a recuperação obtida para o pesticida azoxistrobina nas várias matrizes, que pode por vezes ser próxima de 80 %.

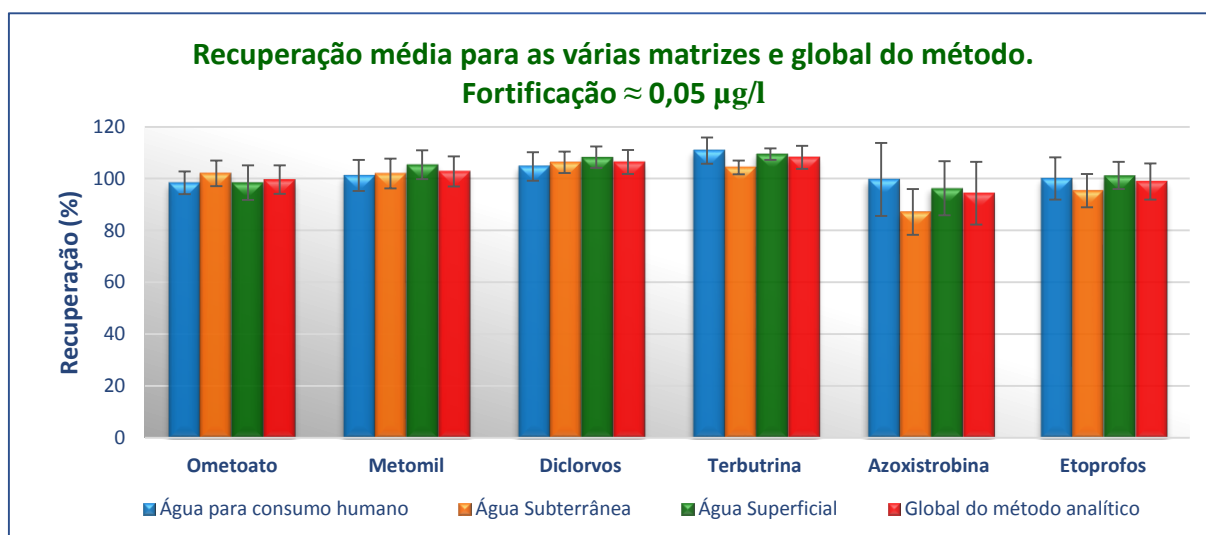


Figura 9.10: Recuperação média da fortificação para as várias matrizes e global do método analítico. Concentração ≈ 0,05 µg/l, média de 8 injeções para cada matriz.

Tabela 9.7: Recuperação média da fortificação para as várias matrizes e global do método analítico. Concentração ≈ 0,05 µg/l, média de 8 injeções para cada matriz.

Pesticidas	Matriz: Consumo		Matriz: Superficial		Matriz: Subterrânea		Global	
	Média (%)	CV (%)	Média (%)	CV (%)	Média (%)	CV (%)	Média (%)	CV (%)
Ometoato	98	4,5	99	6,8	102	4,8	100	5,5
Metomil	101	5,9	105	5,3	102	5,7	103	5,6
Diclorvos	105	5,2	108	3,8	106	3,9	106	4,4
Terbutrina	111	4,6	110	2,0	104	2,5	108	4,1
Azoxistrobina	100	14	96	11	87	10	94	13
Etoprofos	100	8,1	101	5,2	95	6,8	99	7,0

9.1.5 Limite de quantificação do método

O limite de quantificação do método é o limite que se consegue quantificar numa amostra real pela aplicação do método.

Uma vez que o método se baseia na diluição de 1:1 da amostra, o mínimo que se poderia quantificar se existisse 100 % de recuperação corresponderia ao dobro do limite de quantificação da curva de calibração. No entanto, devido à recuperação real poder ser inferior a 100 %, como evidenciado pelos ensaios de recuperação apresentados nas Figura 9.10 e Tabela 9.7 definiu-se que o intervalo de aceitação para as recuperações deste método seria de 70 – 120 %, sendo o limite de quantificação do método afetado de forma a garantir que se consegue quantificar dentro da curva de calibração uma recuperação de 70 %.

Desta forma aplicou-se um limite de quantificação do método igual para todos os pesticidas, tendo sido este limite de 0,05 µg/l, o que corresponde a 0,025 µg/l na curva de calibração, proporcionando um valor superior ao padrão de calibração P1 no caso de uma recuperação de 70 %.

Tabela 9.8: Limite de quantificação do método analítico.

Pesticida	Padrão inferior da gama de trabalho (µg/l)	Fator de Diluição	Recuperação média (%)	LOQ real (µg/l)	LOQ Ajustado (µg/l)	CV (%)	Erro relativo (%)
Ometoato	0,015	2	100	0,036	0,050	5,5	- 0,40
Metomil	0,016		103	0,042		5,6	2,8
Diclorvos	0,016		106	0,040		4,4	6,4
Terbutrina	0,018		108	0,040		4,1	8,2
Azoxistrobina	0,016		94	0,041		13	- 5,6
Etoprofos	0,014		99	0,036		7,0	- 1,1

Com isto foi possível atingir o limite de quantificação de 50 % da norma de qualidade ambiental (NQA) ou valor paramétrico para todos os pesticidas exceto para o pesticida diclorvos, para o qual existe uma NQA de 7×10^{-4} µg/l segundo a Diretiva 2013/39/EU de 12 de Agosto de 2013, sendo esta muito inferior aos 0,05 µg/l, que é limite de quantificação do método.

9.1.6 Incerteza do método

A incerteza do método foi avaliada pelo cálculo da propagação de incertezas (Anexo XIII).

Da avaliação da incerteza verificou-se que a grande contribuição para a incerteza do método foi a interpolação na curva de calibração.

Tabela 9.9: Incerteza do método analítico.

Pesticidas	Incerteza associada à preparação dos padrões de calibração (%)	Incerteza associada à interpolação na curva de calibração (%)	Incerteza associada à precisão intermédia (%)	Incerteza expandida (k = 2) (%)
Ometoato	2,87	5,62	2,07	13,3
Metomil	2,56	9,39	2,82	20,3
Diclorvos	2,73	8,18	2,13	17,8
Terbutrina	2,27	2,90	1,31	7,82
Azoxistrobina	2,48	9,02	2,14	19,2
Etoprofos	5,08	6,68	1,21	17,0

9.1.7 Ensaios interlaboratoriais (EIL) e Material de referência certificado (MRC)

Como passo final da validação do método procedeu-se à análise de materiais de referência certificados, provenientes de ensaios interlaboratoriais fora de prazo, como forma de avaliar a exatidão do método desenvolvido. Estes ensaios interlaboratoriais foram o AQUACHECK 452 de dezembro de 2013 para o diclorvos e AQUACHECK 460 de fevereiro de 2014 para a terbutrina, tendo sido analisados como 3 ensaios independentes e em duplicado em maio de 2014. Os resultados obtidos para estes dois ensaios apresentam-se na Tabela 9.10.

Tabela 9.10: Resultados da análise dos MRC.

AQUACHECK	Concentração de referência (µg/l)	Concentração obtida (µg/l)	Erro relativo (%)
452 (diclorvos)	0,0762	0,0730	-4,23
460 (terbutrina)	0,0866	0,0786	-9,19

Para além da execução destes ensaios com MRC, também se participou no ensaio interlaboratorial AQUACHECK 480 em janeiro/fevereiro de 2015 para a terbutrina, estando o resultado obtido para este na Figura 9.11.

8B - Triazines and Urea Herbicides

Analyte	Analyst	Method	Result	Units	z score (** z' score)	Assigned Value	Uncertainty	SDPA	Exp.SDPA	No of results	Median	Mean	Robust SD	SD
Terbutryn	AMR	Direct aqueous injection LCMS	81.0	ng/L	-1.31	93.2	0.6	9.32	N/A	10	93.4	92.4	5.04	5.48

Figura 9.11: Apresentação do resultado da participação no ensaio interlaboratorial.

Como é possível observar tanto pela análise dos MRC como pelo resultado obtido na participação do ensaio interlaboratorial, este método apresenta um elevado grau de exatidão para os pesticidas avaliados, podendo-se assumir que este elevado grau de exatidão também se aplica aos restantes pesticidas, dado o método de ensaio ser o mesmo.

9.2 GC-ECD

Devido à técnica de GC-ECD ter sido utilizada para complementar a técnica de UPLC-MS/MS, a validação da técnica de GC-ECD começou com os pesticidas aclonifena, alfa-cipermetrina, beta-cipermetrina, teta-cipermetrina, zeta-cipermetrina, dicofol, deltametrina, iprodiona e quinoxifena, os quais não foi possível validar por UPLC-MS/MS até à data do início do estudo com a técnica de GC-ECD.

9.2.1 Escolha do solvente em GC

Devido à necessidade de utilizar um solvente orgânico volátil nas técnicas de GC, testaram-se os solventes acetona, diclorometano e n-hexano, para verificar qual o solvente em que os pesticidas teriam melhor resposta. Para este efeito prepararam-se soluções de aproximadamente 5 mg/l em cada um dos solventes partindo das soluções padrão primárias preparadas em metanol. Como se pode verificar na Figura 9.12 a acetona proporciona uma maior intensidade de pico para os pesticidas iprodiona, cipermetrina total, deltametrina, e aproximadamente igual à intensidade obtida com o solvente n-hexano para os pesticidas aclonifena e quinoxifena, tendo-se decidido utilizar este como solvente.

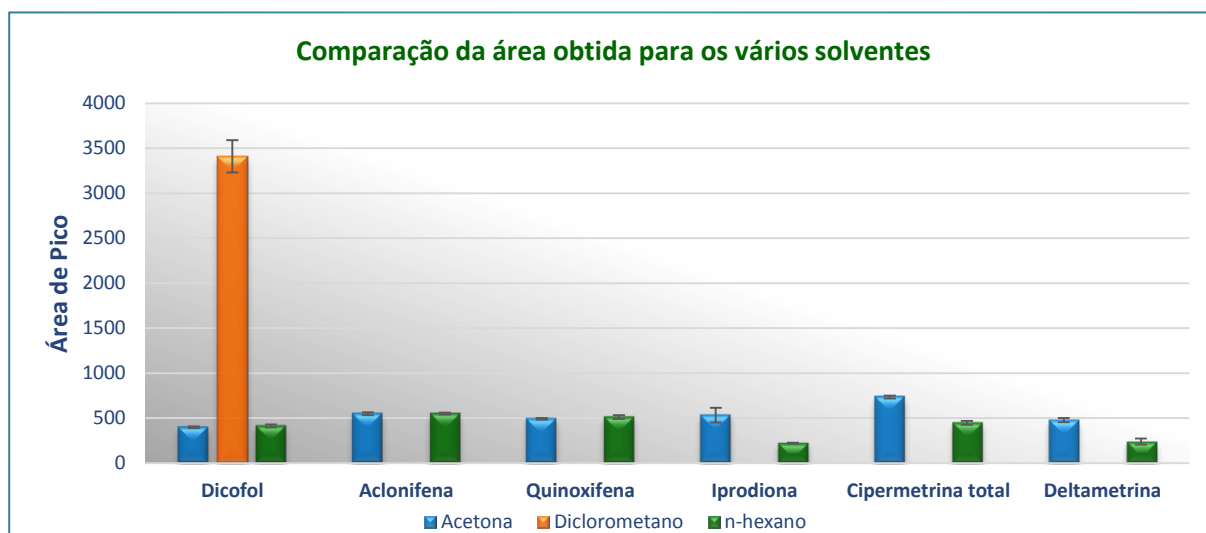


Figura 9.12: Comparação da área obtida para os vários solventes.

9.2.2 Otimização do método de GC-ECD

Para a otimização desta técnica prepararam-se soluções individuais dos pesticidas e uma solução conjunta com concentrações aproximadas de 5 mg/l em acetona. Inicialmente determinaram-se os tempos de retenção para a coluna cromatográfica Agilent HP-5MS (HP-5MS) por injeção de soluções individuais de pesticidas. Note-se

que este detetor não fornece qualquer informação sobre a composição das substâncias que dão origem aos picos cromatográficos. No final foi injetada uma solução conjunta de todos os pesticidas.

Tentou-se otimizar a rampa de temperaturas de forma a resolver a coeluição dos picos dos pesticidas aclonifena e iprodiona. Face ao insucesso obtido, testou-se então a coluna cromatográfica Phenomenex Zebron ZB-MultiResidue-2 (Zebron), determinando novamente os tempos de retenção dos pesticidas individuais. Uma vez verificado que não existia coeluição dos pesticidas, foi esta a coluna com que se continuou a validação do método.

Na Figura 9.13 apresenta-se o cromatograma obtido com a rampa de temperatura utilizada para ambas as colunas cromatográficas.

Note-se que a diferença de intensidade dos picos cromatográficos se deve à utilização de um detetor de ECD com a coluna cromatográfica HP-5MS e um detetor de μ ECD com a coluna cromatográfica Zebron. A utilização de um detetor de ECD e μ ECD com colunas diferentes deveu-se a razões de carácter prático, possibilitando testar ambas as colunas cromatográficas sem ser necessário trocá-las, e devido a estar uma coluna HP-5MS em permanência no detetor de ECD para trabalho de rotina.

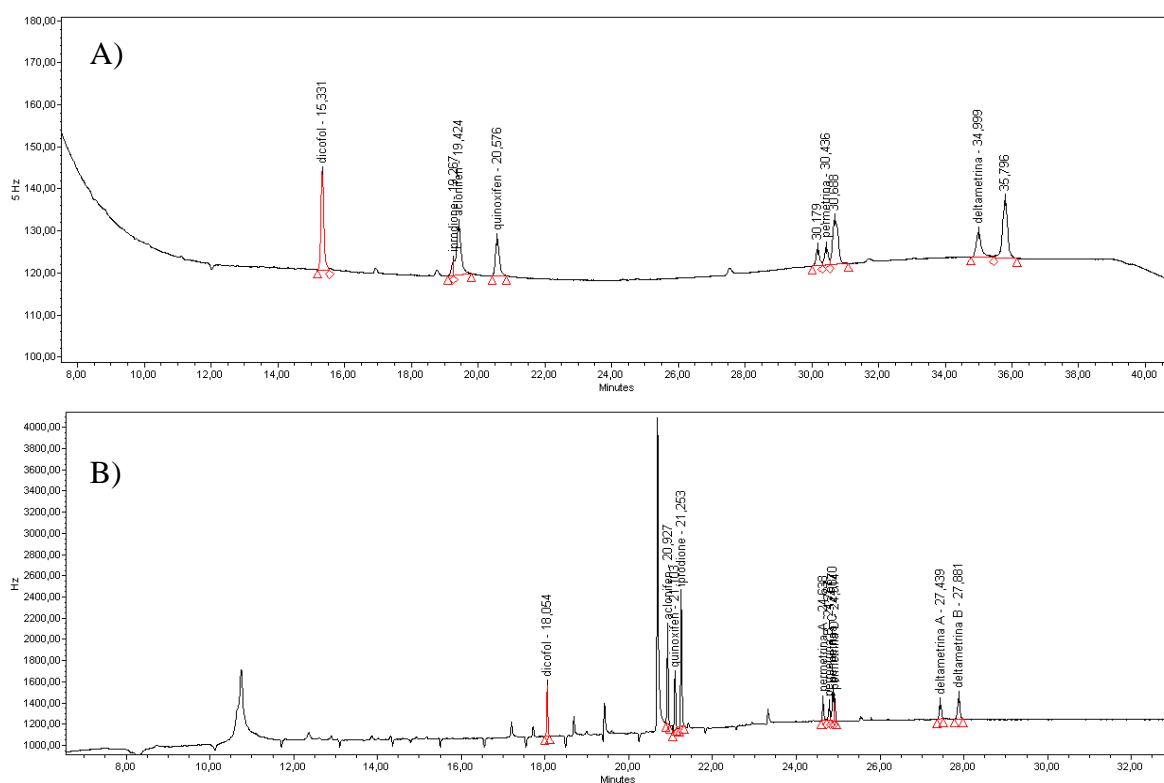


Figura 9.13: Cromatograma das condições otimizadas para a coluna cromatográfica: A) HP-5MS, 30 m x 0,320 mm x 0,25 μ m, B) Zebron, 30 m x 0,320 mm x 0,25 μ m.

Durante a injeção dos pesticidas individuais verificou-se que o pesticida deltametrina apresentava 2 picos, tendo-se decidido integrar ambos individualmente e utilizar a soma dos picos para efeitos de quantificação. Verificou-se ainda que os vários pesticidas cipermetrina apresentavam vários picos coeluídos quando analisados individualmente e em conjunto, tendo-se decidido integrá-los como um único pico para efeitos de quantificação, uma vez que a legislação referente a este conjunto de pesticidas apresenta um NQA para o total das 4 misturas de cipermetrina.

A existência de vários picos para estes compostos deve-se a que o pesticida deltametrina é uma mistura de 2 isómeros e o pesticida cipermetrina é uma mistura de 8 isómeros. A designação alfa, beta-, teta-, zeta- refere-se a misturas isoméricas diferentes e bem definidas deste pesticida, e a intensidade dos 4 picos cromatográficos do pesticida cipermetrina é dependente da composição isomérica da mistura.

O programa final de temperaturas otimizado para a coluna cromatográfica Zebron encontra-se na Figura 8.8 e o programa de temperaturas da coluna cromatográfica HP-5MS encontra-se na Figura 8.12.

9.2.3 Validação da curva de calibração

Esta validação seguiu essencialmente a mesma sequência da validação da curva de calibração para o método de UPLC-MS/MS.

Desta forma efetuaram-se estudos de linearidade recorrendo à avaliação do coeficiente de correlação linear, à análise de resíduos, ao teste de Mandel numa fase inicial.

Posteriormente foram aplicados os testes da homogeneidade de variâncias, de Rikilt e das áreas normalizadas para fortalecer a validação, mas não sendo obrigatório que a curva de calibração passasse todos estes métodos.

9.2.3.1 Testes de linearidade iniciais

Os testes de linearidade iniciais foram o coeficiente de correlação linear e a análise de resíduos, tendo sido possível obter uma gama de linearidade com um coeficiente de correlação linear superior a 0,995 e resíduos compreendidos entre $\pm 15\%$.

O elevado limite inferior da gama de linearidade validada para os pesticidas cipermetrina e deltametrina deve-se a que para ambos existem picos cromatográficos

muito pouco intensos, e a se ter considerado necessário a integração de todos os picos para efeitos de quantificação. Para além deste fator, estes pesticidas apresentavam desvios muito significativos no teste da análise de resíduos.

O elevado limite inferior da gama de linearidade e a ampla gama de linearidade para o pesticida iprodiona devem-se a não ter sido possível obter linearidade na mesma gama que os outros pesticidas, tendo sido necessário alargar a gama de concentrações de forma a se conseguir uma gama de linearidade.

Na Figura 9.14 apresenta-se a representação gráfica da curva de calibração e análise de resíduos para o pesticida aclonifena, estando as restantes representações das curvas de calibração no Anexo V e dos testes da análise de resíduos no Anexo VI. Os resultados da validação das curvas de calibração encontram-se resumidos na Tabela 9.11.

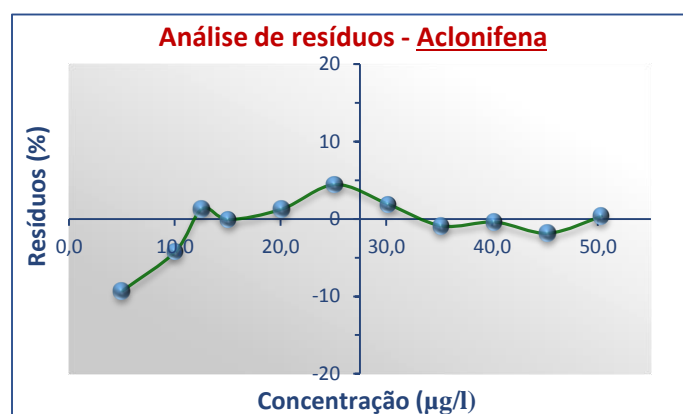
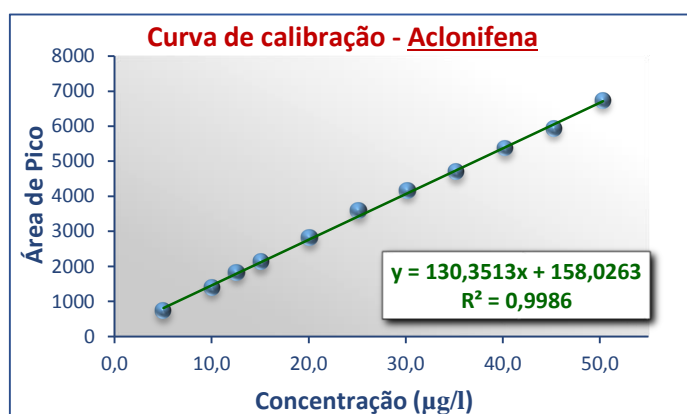


Figura 9.14: Exemplo de uma curva de calibração validada (esquerda), teste da análise de resíduos (direita).

Tabela 9.11: Validação da gama de linearidade para os pesticidas.

Pesticida	Gama de linearidade (µg/l)	Nº de padrões de calibração	R ²	Equação da curva		Teste de Resíduos (%)
				a	b	
Dicofol	5,1 – 51	11	0,9986	151,12	68,236	[-12; 2,9]
Aclonifena	5,0 – 50	11	0,9986	158,03	130,35	[-9,3; 4,4]
Iprodiona	20 – 200	11	0,9967	-100,95	53,049	[-7,8; 11]
Quinoxifena	5,0 – 50	11	0,9985	216,34	69,640	[-9,2; 3,1]
Cipermetrina total	50 – 181	8	0,9988	-704,37	43,601	[-4,7; 6,6]
Deltametrina	63 – 226	8	0,9984	-641,88	24,267	[-5,1; 7,7]

9.2.3.2 Testes de Mandel, Rikilt, Áreas normalizadas e Homogeneidade de variâncias

À semelhança da validação do método de UPLC-MS/MS, estes testes serviram para reforçar a validação da curva de calibração e dar cumprimento à norma ISO 8466-1.

O resultado da aplicação destes testes encontra-se na Tabela 9.12 e Figura 9.15, sendo que a aplicação destes se encontra nos Anexos VIII a XI.

Como é possível observar pela Tabela 9.12, todos os pesticidas passaram no teste de Mandel, sendo que nenhum passou no teste de homogeneidade de variâncias, o que seria de esperar devido à ampla gama de linearidades que se validou. Apenas os pesticidas aclonifena e iprodiona passaram nos testes de Rikilt e áreas normalizadas. No entanto, devido a estes terem passado nos testes de linearidade iniciais considerou-se ser suficiente para a validação das curvas de calibração, sendo sempre necessário executar uma curva de calibração sempre que se execute o método em rotina.

Tabela 9.12: Resultados da aplicação dos testes de Mandel e homogeneidade de variâncias.

Pesticidas	Teste de Mandel		Homogeneidade e de variâncias		Teste de Rikilt (%)	Teste das áreas normalizadas (%)
	F _{95%} (N-3)	VT	F _{99%}	PG		
Dicofol	5,32	3,36		8,65	[92; 112]	[84; 103]
Aclonifena	5,32	3,72		27,05	[95; 106]	[96; 107]
Quinoxifena	5,32	4,99		6,12	[89; 125]	[72; 102]
Iprodiona	5,32	0,23	5,35	112,49	[92; 105]	[96; 109]
Cipermetrina total	6,61	3,63		50,95	[87; 110]	[95; 120]
Deltametrina	6,61	4,18		80,34	[81; 114]	[100; 142]

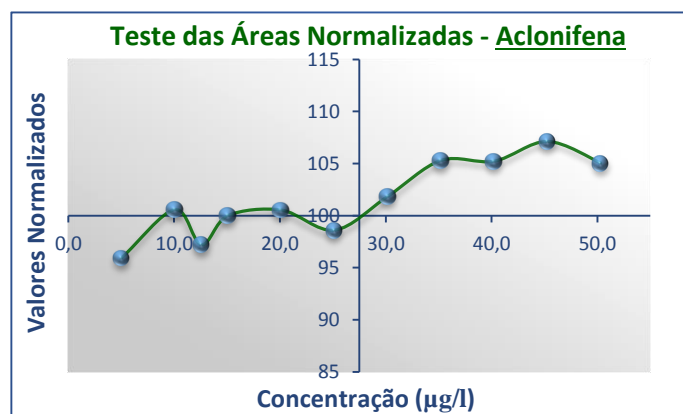
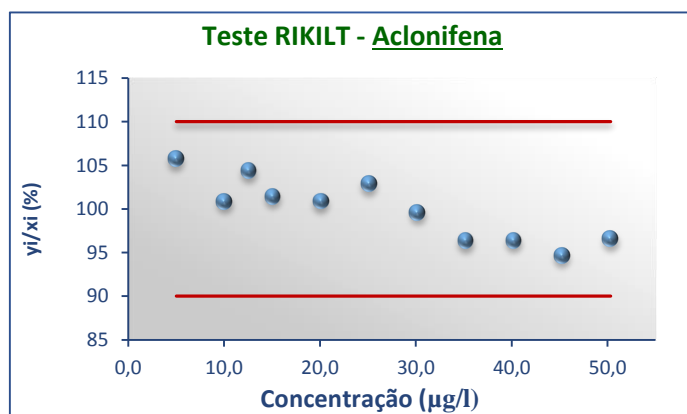


Figura 9.15: Representação do resultado dos testes de Rikilt (esquerda) e áreas normalizadas (direita) para o pesticida aclonifena.

9.2.3.3 Precisão

Este ensaio foi realizado em quatro gamas de concentração, referentes aos padrões de calibração dos extremos das duas gamas de trabalho definidas, tendo sido executados 10 ensaios para cada um destes padrões de calibração.

Os resultados deste estudo estão no Anexo IV estando apresentado na Tabela 9.13 o coeficiente de variação correspondente ao limite inferior da gama de trabalho de cada pesticida. Com este estudo verificou-se que o detetor possui muito boa repetibilidade para todos os pesticidas em ambos os extremos da gama de trabalho.

Esta avaliação também foi executada para os 2 picos da deltametrina separadamente, tendo-se observado que ambos os picos apresentam boa repetibilidade individualmente. O mesmo foi avaliado para os picos da cipermetrina, para os quais, embora estando coeluidos, foi também possível verificar a sua muito boa repetibilidade.

Tabela 9.13: Coeficiente de variação obtido pelo estudo de repetibilidade (n = 10) para a solução padrão de calibração correspondente ao limite inferior da gama de trabalho.

Pesticidas	CV (%)
Dicofol	2,81
Aclonifena	2,75
Quinoxifena	4,22
Iprodiona	1,98
Cipermetrina total	2,43
Deltametrina	3,49

9.2.3.4 Limiares analíticos

À semelhança deste teste para a técnica de UPLC-MS/MS, os limiares analíticos foram determinados com recurso à análise sucessiva de padrões correspondentes ao padrão do limite inferior da gama de trabalho, tendo-se procedido aos cálculos de acordo com o Anexo XII.

Como é possível observar na Tabela 9.14, os limiares analíticos LOD e LOQ calculados são muito inferiores ao limite inferior da curva de calibração validada, não sendo executado quaisquer modificações na gama de trabalho que se pretendia validar.

Tabela 9.14: Avaliação dos limiares analíticos.

Pesticidas	Limite inferior da gama de Linearidade (µg/l)	LOD (µg/l)	LOQ (µg/l)	CV (%)	Erro relativo (%)
Dicofol	5,1	0,54	1,8	4,3	- 18
Aclonifena	5,0	0,50	1,7	3,4	- 4,3
Quinoxifena	20	0,94	3,1	7,3	- 15
Iprodiona	5,0	1,3	4,5	1,8	22
Cipermetrina total	50	2,9	9,6	1,7	10
Deltametrina	63	4,4	15	2,1	8,6

9.2.4 Ensaios de Recuperação

Os ensaios de recuperação foram executados recorrendo inicialmente à técnica de SPE, tendo-se executado um ensaio de LLE devido a se verificar um elevado número de interferentes quando se executou SPE como método de preparação da amostra. Deste ensaio foi possível executar a comparação entre estas duas técnicas de extração. Na restante fase do trabalho foi utilizado o SPE como método de preparação da amostra.

9.2.4.1 Escolha do cartucho de extração em fase sólida para o método de SPE.

Inicialmente testou-se o método existente para pesticidas organoclorados, com o cartucho Oasis HLB de 200 mg, devido a este ser o tipo de cartucho padrão para extração de pesticidas em amostras de água, sendo utilizado água ultrapura como amostra.

Devido às baixas recuperações para alguns pesticidas, testaram-se 2 outros cartuchos de SPE, o cartucho Isolute C18 (EC) de 1 g e o Chromabond HR-P de 500 mg, podendo-se observar na Figura 9.16 os resultados obtidos por este estudo.

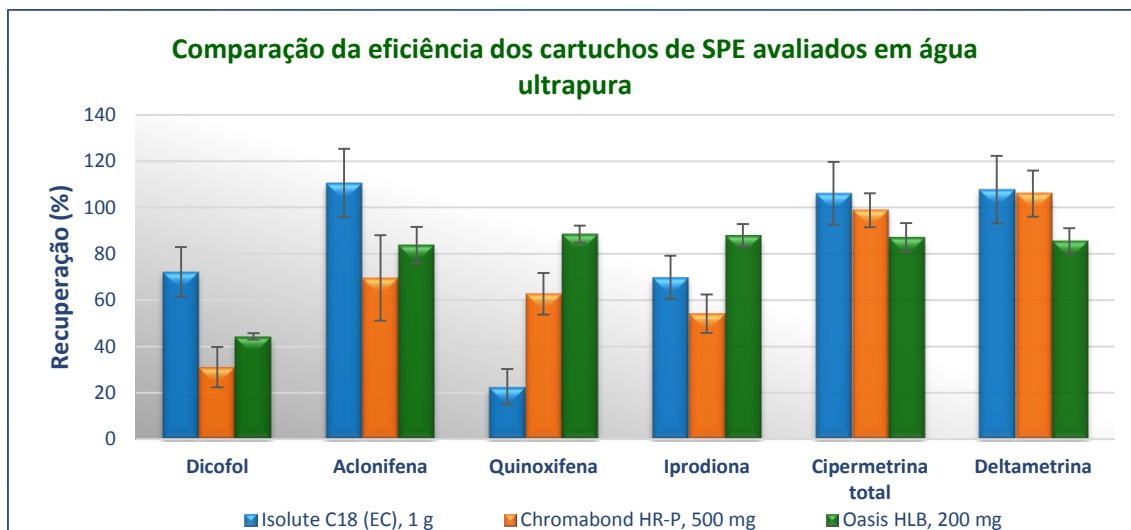


Figura 9.16: Recuperação média para os cartuchos de SPE avaliados em água ultrapura.

Devido ao cartucho Oasis HLB proporcionar recuperações satisfatórias para todos os pesticidas, exceto para o dicofol, e com um coeficiente de variação mais pequeno para todos os pesticidas, decidiu-se utilizar este cartucho. No entanto, depois de se testar com uma amostra de água para consumo humano e se ter obtido muito baixas recuperações, reavaliou-se o uso do cartucho de Isolute C18 (EC), devido a este ter demonstrado boas recuperações para alguns dos pesticidas no ensaio em água ultrapura, mas com maior coeficiente de variação que o cartucho Oasis HLB.

A Figura 9.17 permitiu avaliar os resultados deste estudo em água para consumo humano, tendo-se decidido no final utilizar o cartucho Isolute C18 (EC) de 1 g.

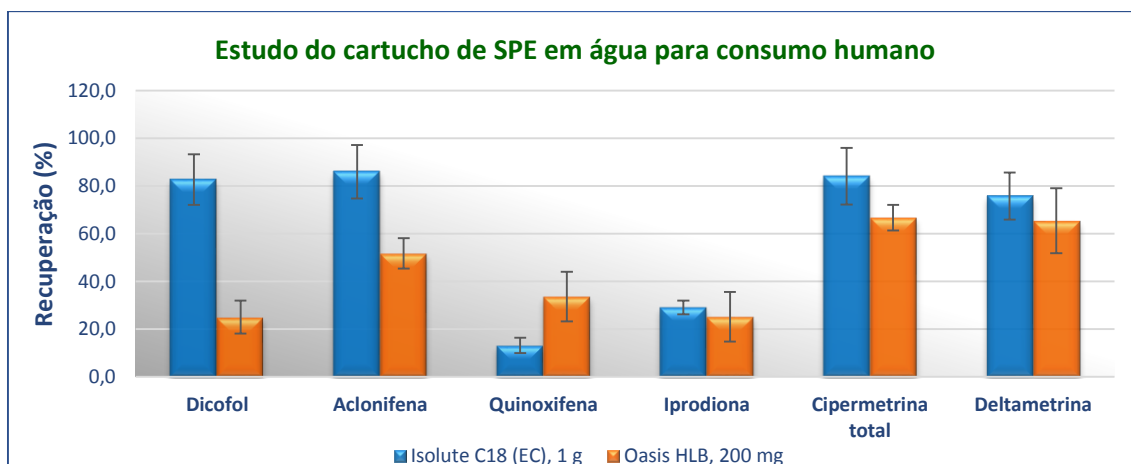


Figura 9.17: Recuperação média para os cartuchos de SPE Isolute C18 (EC) de 1 g e Oasis HLB de 200 mg em água para consumo humano.

9.2.4.2 *Estudo dos interferentes*

Devido à existência de uma grande interferência por parte de outras substâncias presentes na amostra, o que impossibilitaria a observação dos picos dos pesticidas em amostras de águas superficiais e subterrâneas (Figura 9.18), avaliou-se por um lado a utilização da técnica de LLE para o processo de extração, e por outro a utilização de um passo de limpeza do extrato obtido com a técnica de SPE.

Como se pode verificar pela Figura 9.18 A/B e C/D, este problema não é tão prevalente em amostras de água para consumo humano, sendo possível identificar os picos da fortificação desta (Figura 9.18 B). No entanto, como se pode observar pelo branco de água superficial (Figura 9.18 C) e a fortificação de água subterrânea (Figura 9.18 D), o efeito de matriz mascara completamente os picos dos pesticidas.

Note-se que a detecção de cipermetrina e deltametrina no branco de água para consumo humano não é significativa, sendo inferior a 10 % da área do padrão de calibração mais baixo, e devendo-se possivelmente a contaminação no processo de SPE, uma vez que a concentração destes pesticidas na fortificação é muito elevada.

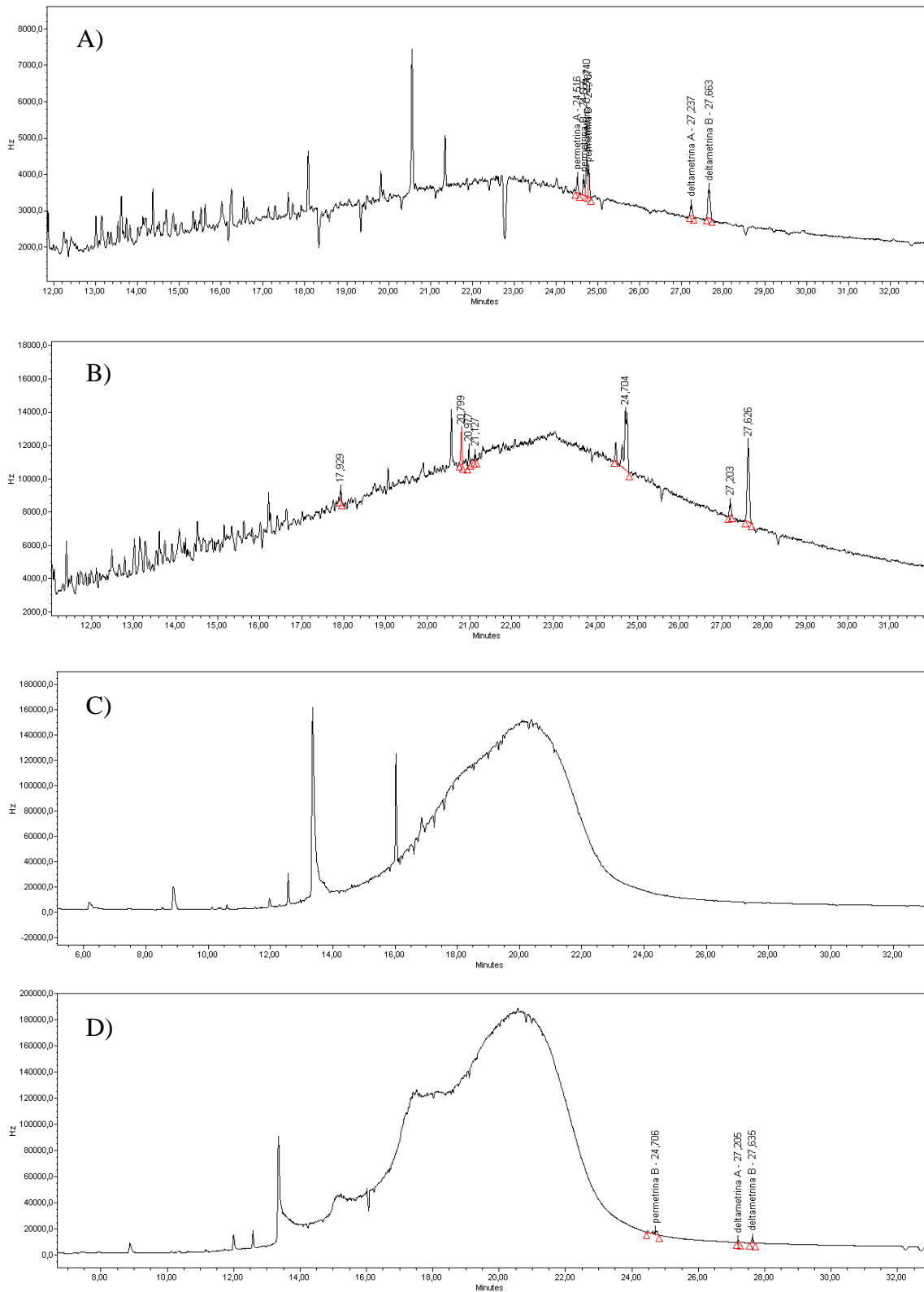


Figura 9.18: Cromatogramas de amostras extraídas por SPE. A) Branco de água para consumo humano, B) Fortificação de água para consumo humano, C) Branco de água superficial, D) Fortificação de água subterrânea.

9.2.4.2.1 Método de extração líquido-líquido

O estudo de LLE consistiu numa única série de trabalho que incidiu sobre água para consumo humano, tendo-se preparado 3 recuperações e 1 ensaio de uma amostra da mesma matriz.

Como se pode verificar por comparação entre as Figuras 9.18 B e 9.19 B conseguiu-se melhorar um pouco o problema dos interferentes, o que provavelmente se deve a este tipo de extração não ser tão eficiente para a extração dos interferentes. A aparente linha de base bem definida do branco para a mesma matriz (Figura 9.19 A), deve-se ao efeito da escala do cromatograma devido a um pico desconhecido muito intenso.

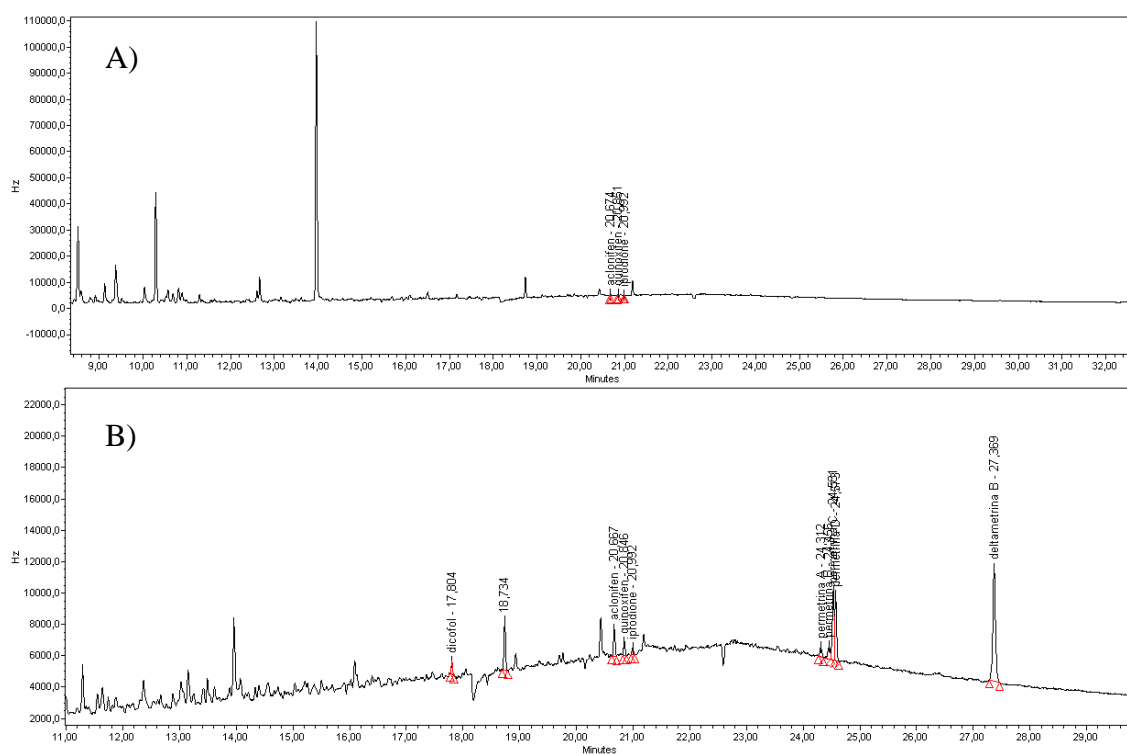


Figura 9.19: Cromatogramas do método de LLE. A) Branco de água para consumo humano; B) Fortificação em água para consumo humano.

No entanto, este método também se revelou pouco eficiente para a extração de vários pesticidas. Como se pode observar na Figura 9.20 a recuperação para os pesticidas iprodiona e quinoxifena foi muito baixa, sendo esta também inferior a 50 % para o pesticida dicofol.

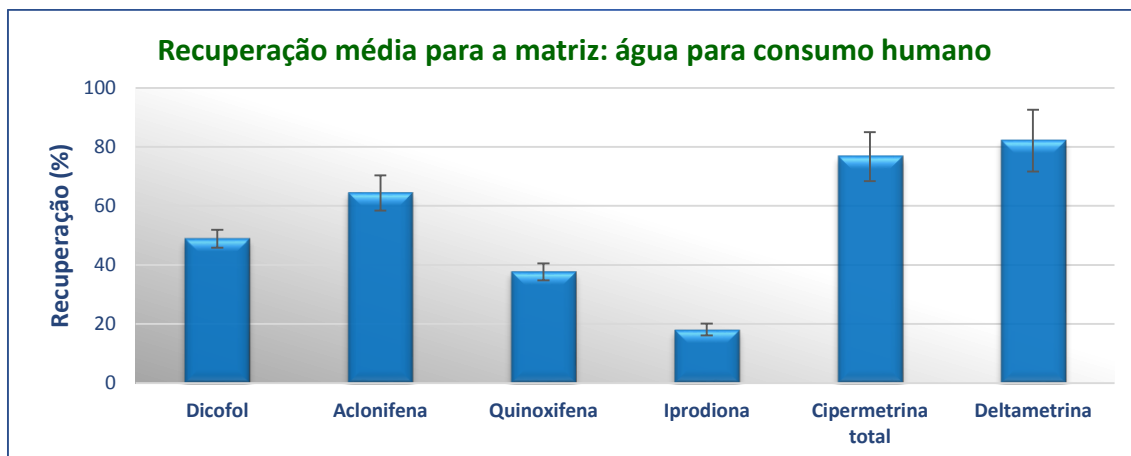


Figura 9.20: Recuperação média do método de LLE para a matriz: água para consumo humano.

9.2.4.2.2 Comparação dos métodos de SPE e LLE

Comparando as recuperações obtidas para ensaio de LLE com as recuperações obtidas com o cartucho de SPE Isolute C18 (EC), 1 g para a matriz de água para consumo humano, pode-se verificar que o método de SPE seria mais eficiente que o método de LLE para a maioria dos pesticidas (Figura 9.21).

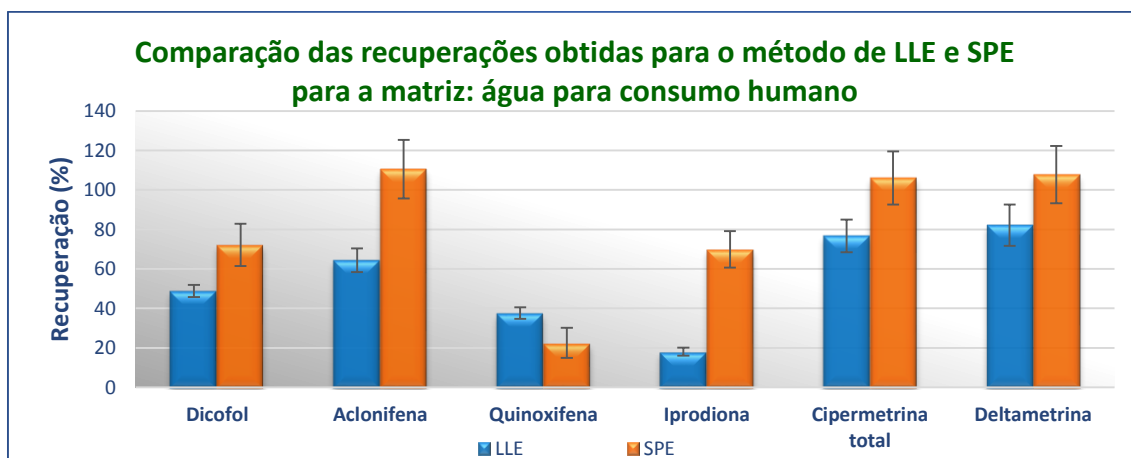


Figura 9.21: Comparação entre as recuperações obtidas para o ensaio teste de LLE e de SPE com o cartucho Isolute C18 (EC), 1 g.

Por outro lado o extrato obtido pelo método de LLE proporcionou cromatogramas com uma linha de base melhor definida (Figura 9.19) do que a linha de base do cromatograma obtido para o extrato obtido pelo método de SPE (Figura 9.18). Este facto deve-se em parte, à técnica de SPE ser mais eficiente na extração, sendo esta eficiência tanto para os pesticidas como para os interferentes.

Com base nestes resultados, maior eficiência de recuperação com a técnica de SPE mas maior indefinição da linha de base, avaliou-se a possibilidade de utilizar um método de limpeza do extrato do SPE de forma a melhorar aquele último ponto.

9.2.4.2.3 Processo de limpeza para o extrato de SPE

O processo de limpeza do extrato de SPE encontra-se descrito no Capítulo 8.7.2.1. Como se pode observar pelos cromatogramas de extratos filtrados na Figura 9.23 e comparando com a Figura 9.18, este filtro foi significativamente eficaz na redução do efeito dos interferentes, tendo-se decidido aplicá-lo a todas as amostras.

No entanto, devido à influência que este demonstrou ter nos resultados para a matriz de água para consumo humano (Figura 9.22), e de se ter considerado não ser estritamente necessário o passo de limpeza do extrato para esta matriz (Figura 9.18), decidiu-se que o passo de limpeza do extrato só seria aplicado a matrizes de água superficial e subterrânea.

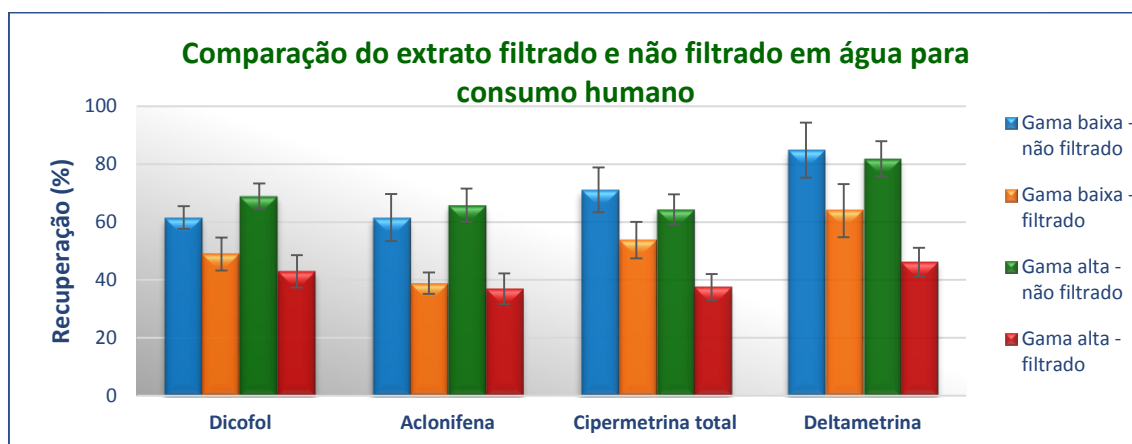


Figura 9.22: Comparação da recuperação com e sem filtração do extrato de SPE em amostras de água para consumo humano. **Gama baixa:** aclonifena e dicofol = 0,007 µg/l, cipermetrina total e deltametrina = 0,030 µg/l; **Gama alta:** aclonifena e dicofol = 0,014 µg/l, cipermetrina total e deltametrina = 0,060 µg/l.

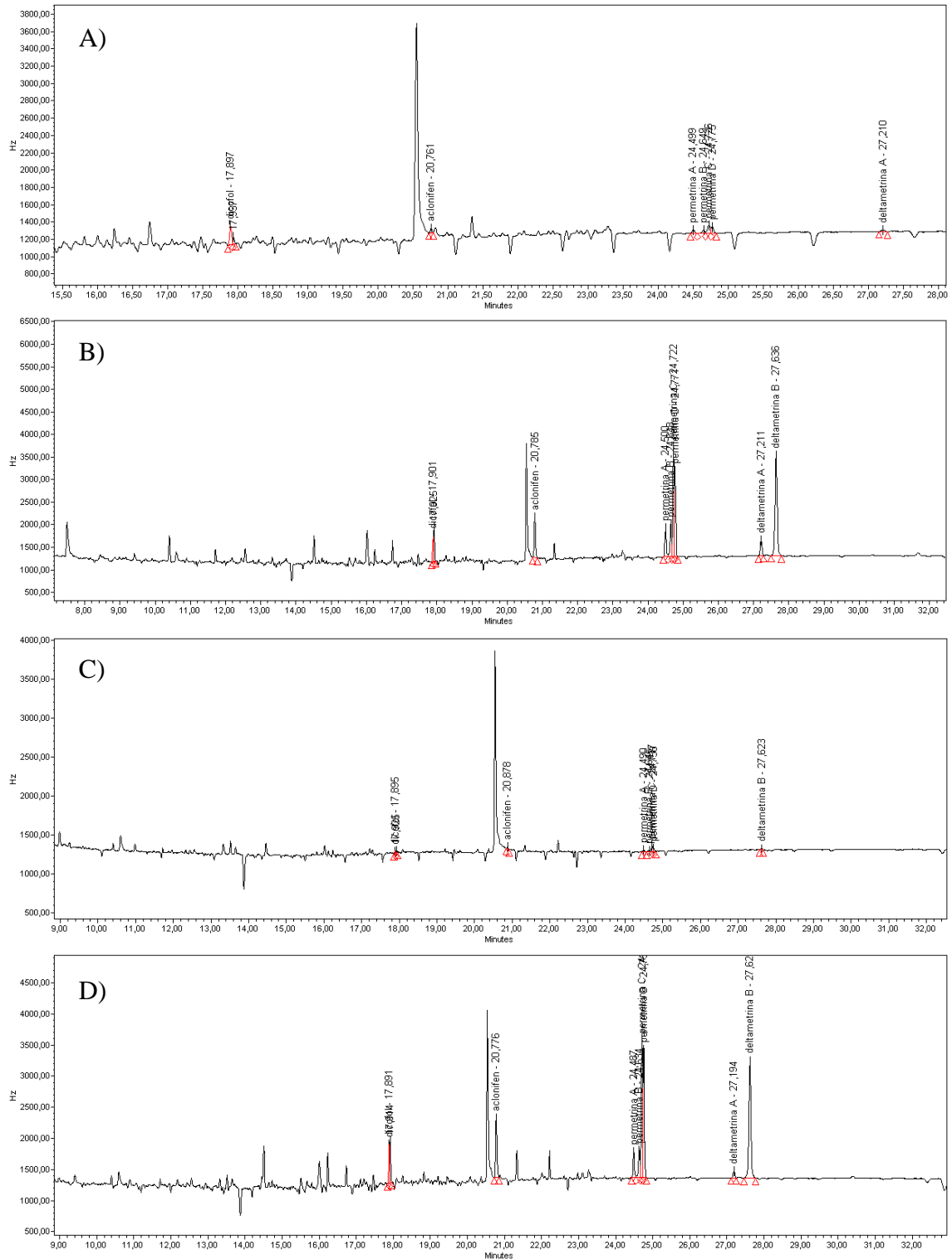


Figura 9.23: Cromatogramas do extrato de SPE filtrado. A) Branco de água subterrânea, B) fortificação de água subterrânea, C) Branco de água superficial, D) Fortificação de água superficial.

9.2.4.3 Ensaio de recuperação

Para este fim dever-se-ia proceder pelo menos a 6 – 10 recuperações independentes para uma gama de concentrações próxima do mínimo da curva de calibração e para uma concentração intermédia. No entanto apenas se realizaram 11 recuperações para a gama baixa e alta de água para consumo humano e 6 recuperações para a gama baixa de concentrações nas matrizes água subterrânea e água superficial, devido a constrangimentos de tempo e elevado volume de amostra necessário.

Com estes ensaios foi possível verificar que as recuperações para os pesticidas aclonifena, deltametrina e dicofol e não variam muito de matriz para matriz, mesmo tendo em conta o passo de limpeza do extrato para as amostras de água subterrânea e superficial. Por outro lado, para o pesticida cipermetrina total verificou-se que para as matrizes que necessitam do passo de limpeza as recuperação é mais baixa, podendo este facto ser devido ao filtro reter parcialmente este pesticida. No entanto, não foi feito qualquer trabalho no sentido de avaliar e minimizar esta potencial influência do filtro utilizado devido a constrangimentos de tempo e também porque as recuperações médias se mostraram minimamente aceitáveis.

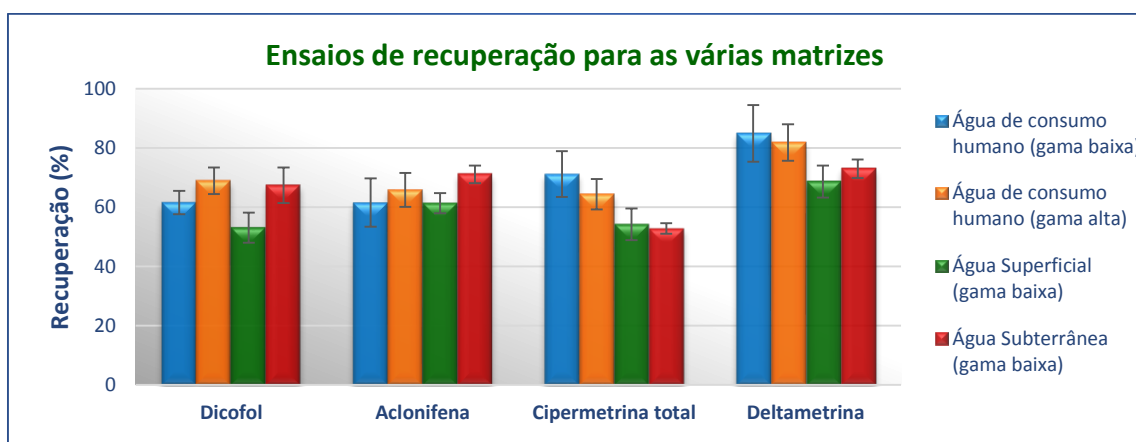


Figura 9.24: Recuperação média de cada pesticida em cada uma das matrizes avaliadas. **Gama baixa:** aclonifena e dicofol = 0,007 µg/l, cipermetrina total e deltametrina = 0,030 µg/l; **Gama alta:** aclonifena e dicofol = 0,014 µg/l, cipermetrina total e deltametrina = 0,060 µg/l.

Tabela 9.15: Dados da representação gráfica da Figura 9.24.

Pesticida	Água para consumo humano (gama baixa)			Água para consumo humano (gama alta)			Água Superficial (gama baixa)			Água subterrânea (gama baixa)		
	Nº análises	Média (%)	CV (%)	Nº análises	Média (%)	CV (%)	Nº análises	Média (%)	CV (%)	Nº análises	Média (%)	CV (%)
Dicofol	10	62	6,4	9	69	6,5	5	53	9,6	6	63	8,9
Aclonifena	11	62	13	9	66	8,7	5	61	5,6	5	71	4,2
Cipermetrina total	11	71	11	9	64	8,0	5	54	9,8	5	53	3,4
Deltametrina	11	85	11	9	82	7,5	5	69	7,8	5	73	4,3

9.2.5 Limite de quantificação do método

Devido ao método recorrer a uma técnica de extração, o limite de quantificação do método tem em conta a eficiência das recuperações bem como o fator de concentração utilizado na extração.

Neste método a extração e concentração são feitas passando de 2 l de amostra para 0,5 ml de extrato para analisar. Como tal o extrato é 4000 vezes mais concentrado do que a amostra real.

Os valores do limite de quantificação do método analítico estão apresentados na Tabela 9.16, sendo apresentados dois valores diferentes para o pesticida cipermetrina total devido a este apresentar valores de recuperação significativamente diferentes para a matriz de água para consumo humano, em relação às outras matrizes. Para os pesticidas aclonifena, deltametrina e dicofol apresenta-se o valor global do método devido a não existir uma grande variação nas recuperações destes pesticidas. O elevado erro relativo para a maioria dos pesticidas deve-se essencialmente às baixas recuperações, uma vez que o cálculo deste não tem em conta a recuperação média de cada pesticida.

Os LOQ obtidos para os pesticidas estudados são inferiores ao critério de aceitação referido para o LOQ de pesticidas de acordo com o valor paramétrico de 0,1 µg/l do Decreto-Lei 306/2007 de Agosto relativo a água para consumo humano. No caso da aplicabilidade deste método para análise de águas superficiais e subterrâneas (Diretiva 2013/39/EU de 12 de Agosto), o LOQ obtido é inferior ao critério de aceitação (30 %) definido para o NQA estabelecido para o pesticida aclonifena. Os únicos pesticidas que não cumprem o critério de aceitação do LOQ para o dicofol e cipermetrina total. O LOQ

destes pesticidas é também superior ao valor da NQA estabelecida na Diretiva 2013/39/EU de 12 de Agosto.

Devido à gama de recuperações obtidas definiu-se que o intervalo de aceitação para as recuperações deste método seria de 70 % \pm 20 %.

Tabela 9.16: Limite de quantificação do método analítico.

Pesticidas	Matriz	Padrão inferior da gama de trabalho ($\mu\text{g/l}$)	Fator de concentração	Recuperação média (%)	LOQ real ($\mu\text{g/l}$)	LOQ Ajustado ($\mu\text{g/l}$)	CV (%)
Dicofol	Todas	5,10		61	0,003	-	12
Aclonifena	Todas	5,00		64	0,003	-	12
Cipermetrina total	Superficial e Subterrânea	50,0	4000	54	0,027	0,030	7,1
	Consumo			71	0,020		11
Deltametrina	Todas	63,0		78	0,022	0,030	13

9.2.6 Incerteza do método

A incerteza deste método foi calculada da mesma forma que para o método de UPLC-MS/MS, sendo calculada pela propagação das incertezas ao longo do processo analítico. A incerteza associada à preparação de padrões para os pesticidas cipermetrina foi calculada pela combinação da incerteza relativa à preparação de cada padrão.

Para os pesticidas aclonifena, dicofol e deltametrina a maior contribuição para a incerteza esteve associada à curva de calibração, sendo esta muito menor para o pesticida deltametrina devido à concentração ser mais elevada para o primeiro padrão de calibração do que para os outros 2 pesticidas. Para os pesticidas cipermetrina a maior contribuição foi da preparação dos padrões de calibração. Isto deveu-se a que esta incerteza engloba todas as incertezas associadas a 4 formulações diferentes, tendo-se executado um maior número de passos na preparação da solução conjunta para este pesticida, o que confere um maior número de fontes de incerteza do que para os restantes pesticidas.

A incerteza para os pesticidas dicofol e aclonifena é mais elevada do que para os outros dois pesticidas. Isto deve-se a estes estarem numa concentração mais baixa que os outros pesticidas.

Tabela 9.17: Incerteza do método analítico.

Pesticidas	Incerteza associada à preparação dos padrões de calibração (%)	Incerteza associada à interpolação na curva de calibração (%)	Incerteza associada à precisão intermédia (%)	Incerteza expandida (k =2) (%)
Dicofol	2,49	13,5	1,36	27,6
Aclonifena	2,18	13,7	1,19	27,8
Cipermetrina total	5,65	4,13	0,77	14,1
Deltametrina	0,80	4,64	1,08	9,66

10 Conclusões e perspectivas futuras

Com o trabalho desenvolvido foi possível validar dois métodos de ensaio, um por UPLC-MS/MS para 6 pesticidas (azoxistrobina, diclorvos, etoprofos, metomil, ometoato e terbutrina), e outro por GC-ECD para 4 pesticidas (aclonifena, cipermetrina total, deltametrina e dicofol), aos quais não foi possível aplicar o primeiro método.

Ao longo da validação do método de UPLC-MS/MS foi possível verificar que este método não poderia ser aplicado a 6 dos 14 pesticidas (aclonifena, cipermetrina total, deltametrina, dicofol, iprodiona e quinoxifena) que constituíam o grupo de trabalho, tendo estes constituído o grupo de trabalho de GC-ECD.

Assim, do grupo de trabalho de partida, constituído por 14 pesticidas, apenas não foi possível validar um método analítico para 4 pesticidas.

10.1 UPLC-MS/MS

A gama de trabalho validada para o método de UPLC-MS/MS para 7 pesticidas (azoxistrobina, diclorvos, etoprofos, metomil, ometoato e terbutrina e tiodicarbe) foi de aproximadamente 0,016 a 0,1 µg/l, sendo a gama validada para o pesticida bifenoX de 12 a 100 µg/l. A gama de linearidade apresenta para todos os pesticidas um coeficiente de correlação linear superior a 0,995, resíduos inferiores a $\pm 15\%$, passando também nos testes de Mandel, Rikilt e áreas normalizadas. O pesticida ometoato foi, no entanto, o único a passar no teste de homogeneidade de variâncias. Por outro lado, a curva de calibração apresentou para todos os compostos um coeficiente de variação inferior a 15% para a razão de confirmação.

A repetibilidade é bastante boa para a maioria dos pesticidas, apresentando um coeficiente de variação inferior a 15 %. No que diz respeito à razão de confirmação, o coeficiente de variação foi inferior a 15 % para a maioria dos pesticidas. Apenas os pesticidas azoxistrobina e bifenoX apresentaram um coeficiente de variação inferior a 20 %. Este valor é, no entanto, aceitável em face da muito boa repetibilidade apresentada para a transição de quantificação.

O método cromatográfico apresenta um tempo de corrida de 8 minutos, o que tendo em conta o equipamento utilizado, é um bom tempo de corrida, permitindo sessões de trabalho bastante curtas.

O método de preparação de amostras desenvolvido demonstrou resolver de forma muito satisfatória o efeito de matriz inicialmente verificado, possibilitando recuperações em geral superiores a 80 % para 6 dos pesticidas nas várias matrizes estudadas. Para além da elevada recuperação, este método também apresentou um coeficiente de variação global do método para cada pesticida significativamente inferior a 15 %, sendo igual ou inferior a 7 % para 5 dos 6 pesticidas.

Por não ter sido possível atingir o limite de quantificação exigido pela norma de qualidade ambiental (NQA) imposta pela Diretiva 2013/39/EU de 12 de Agosto para o pesticida bifenox e devido à elevada supressão iónica observada para o pesticida tiodicarbe, o seu estudo foi abandonado ao longo da validação do método analítico.

De forma a garantir uma boa margem de segurança na quantificação, ou seja, para garantir que se trabalha sempre dentro da curva de calibração validada, o limite de quantificação para os 6 pesticidas (azoxistrobina, diclorvos, etoprofos, metomil, ometoato e terbutrina) foi majorado para 0,05 µg/l, aceitando-se recuperações de 70 a 120 % para ensaios de recuperação. Isto possibilita atingir um valor de 50 % do valor paramétrico ou NQA imposto pela legislação para os vários pesticidas. O único pesticida que não cumpriu a NQA imposta pela Diretiva 2013/39/EU de 12 de Agosto, em águas superficiais, foi o pesticida diclorvos.

Na estimação de incertezas verificou-se que a incerteza expandida para os vários pesticidas é bastante aceitável, sendo próxima ou inferior a 20 %.

O método desenvolvido com a técnica de UPLC-MS/MS apresenta elevada exatidão para os pesticidas diclorvos e terbutrina, como foi verificado pela análise de dois materiais de referência certificados (MRC), para os quais se observaram erros relativos inferiores a 10% e também pela participação em um ensaio interlaboratorial para o pesticida terbutrina onde se obteve um z-score de -1,31.

Em relação aos pesticidas bifenoX e tiodicarbe que foram abandonados na fase final da validação do método experimental, embora não validados, entraram em testes preliminares de SPE que demonstraram ser promissores, não só para estes, bem como para alguns dos pesticidas presentes no método validado. Assim, o desenvolvimento de um método SPE como método de extração poderá no futuro permitir a análise destes 2 pesticidas bem como ainda baixar o limite de quantificação para alguns dos pesticidas do método validado neste trabalho.

10.2 GC-ECD

Para a técnica de GC-ECD avaliaram-se 2 colunas cromatográficas, tendo-se optado pela coluna Phenomenex Zebron ZB-MultiResidue-2 de 30 m com 0,320 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de fase estacionária.

A gama de trabalho validada para esta técnica é muito variada em relação à gama de concentrações, sendo que todas apresentaram um coeficiente de correlação linear superior a 0,995, bem como resíduos inferiores a ± 15 %. Todas as curvas passaram no teste de Mandel.

Apenas os pesticidas aclonifena e iprodiona passaram nos testes de Rikilt e áreas normalizadas, não passando nenhum no teste de homogeneidade de variâncias.

A repetibilidade obtida para todos os pesticidas estudados a uma concentração equivalente ao padrão do limite inferior da gama de trabalho apresenta um coeficiente de variação muito inferior a 15 %.

Na otimização do método cromatográfico para a análise destes pesticidas conseguiu-se tempos de corrida de 33 minutos. Face ao método cromatográfico, pode-se considerar que o tempo de corrida cromatográfica obtido é muito razoável.

Quanto à preparação de amostras, avaliaram-se 3 cartuchos de SPE, e ainda o método de LLE devido ao elevado número de interferentes extraídos pelo método de SPE. No entanto, após vários estudos, optou-se pelo método de SPE utilizando o cartucho Isolute C18 (EC) com 1 g de enchimento, seguido de um processo de limpeza do extrato obtido.

No processo de desenvolvimento do método de preparação de amostra observou-se que as várias opções avaliadas apresentavam recuperações muito baixas (< 50 %) para os pesticidas quinoxifena e iprodiona, tendo estes sido abandonados.

Para os pesticidas dicofol e aclonifena obteve-se uma recuperação de aproximadamente 60 % para o global das matrizes em estudo, com um coeficiente de variação inferior a 15 %. O limite de quantificação do método validado para estes pesticidas é de 0,003 µg/l, sendo este muito inferior a 30 % do valor paramétrico (0,1 µg/l para pesticidas individuais) imposto pela legislação nacional das águas de consumo humano. No entanto, este limite de quantificação não é suficientemente baixo para atingir a NQA imposta pela Diretiva 2013/39/EU de 12 de Agosto, para o pesticida dicofol ($1,3 \times 10^{-3}$ µg/l), em águas superficiais.

Para o pesticida cipermetrina total obteve-se uma percentagem de recuperação muito diferente para a matriz de água para consumo humano em relação às matrizes de água superficial e subterrânea. As percentagens de recuperação foram significativamente inferiores para as matrizes de água superficial e subterrânea. Assim, de forma a conseguir uma uniformização para as várias matrizes, majorou-se o limite de quantificação do método para 0,03 µg/l. Este limite de quantificação permite atingir 30 % do valor paramétrico imposto pela legislação nacional das águas de consumo humano. No entanto, este limite de quantificação não é suficientemente baixo para atingir a NQA imposta pela Diretiva 2013/39/EU de 12 de Agosto para o pesticida cipermetrina total (6×10^{-4} µg/l), em águas superficiais.

Para o pesticida deltametrina obteve-se uma recuperação de aproximadamente 80 % para o global das matrizes em estudo, com um coeficiente de variação inferior a 15 %. O limite de quantificação do método validado para este pesticida é de 0,022 µg/l, sendo majorado para 0,03 µg/l, em linha com o limite do método para o pesticida cipermetrina total. Este é igual a 30 % do valor paramétrico imposto pela legislação nacional das águas de consumo humano. No caso da Diretiva 2013/39/EU de 12 de Agosto, não existe uma NQA definida para este pesticida.

Como forma de concluir a validação deste método analítico seria necessário a realização de mais ensaios de recuperação, bem como a participação em ensaios interlaboratoriais para averiguar a exatidão do método.

Em futuros estudos devem de ser otimizados novos métodos de ensaio que permitam a análise dos pesticidas bifenox, cipermetrina total, dicofol, diclorvos, iprodiona, quinoxifena e tiodicarbe de modo a cumprir as especificações exigidas pela Diretiva 2013/39/EU de 12 de Agosto, para águas superficiais.

12 Bibliografia

- [1] **Pidwirny, M.** "Atmospheric Humidity". *Fundamentals of Physical Geography*, 2nd Edition. [Consultado a 12 de Janeiro de 2015] <http://www.physicalgeography.net/fundamentals/8c.html>
- [2] **Simas, Luís F.** *Água para consumo humano – Perspectivas Gerais sobre as suas características e o seu Tratamento*, Boletim da Sociedade Portuguesa da Química Nº67, Outubro-Dezembro 1997, pag.15-20.
- [3] **EPAL.** *Empresa Portuguesa de Águas Livres, SA*. [Última consulta a 12 de Janeiro de 2015] <http://www.epal.pt>
- [4] **“pest”, Encyclopædia Britannica.** *Encyclopædia Britannica Online*. Encyclopædia Britannica, Inc. [Consultado a 26 de Novembro de 2014] <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/453421/pest>
- [5] **Appleby, Arnold P.; Müller, Franz; Carpy, Serge.** “Weed Control”. *Ullmann’s Encyclopedia of Industrial Chemistry, Electronic Release*. Weinheim: Wiley-VCH, Março 2007.
- [6] **World Health Organization.** *Guidelines for Drinking-water Quality – 4th Edition*. Malta: Gutenberg, 2011. ISBN 978 92 4 154815 1.
- [7] **Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV).** “Plano de Ação Nacional para o uso sustentável dos produtos fitofarmacêuticos – Estabelecimento e Implementação – Volume 1.” Direção Regional da Agricultura e Pescas do Centro (DRAP Centro). [Consultado a 13 de Janeiro de 2015] http://www.drapc.min-agricultura.pt/base/geral/files/PAN_Vol%20I%20_final_%20rev1.pdf
- [8] **World Health Organization.** *The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2009*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 2010. ISBN 978 92 4 154796 3.
- [9] *Decreto-Lei Nº 306/2007 de 27 de Agosto de 2007*
- [10] **Müller, Franz; Streibert, Hans P.; Farooq, Saleem.** “Acaricides”. *Ullmann’s Encyclopedia of Industrial Chemistry, Electronic Release*. Weinheim: Wiley-VCH, Março 2007.
- [11] **Ackermnn, Peter; Margot, Paul; Müller, Franz.** “Fungicides, Agricultural”. *Ullmann’s Encyclopedia of Industrial Chemistry, Electronic Release*. Weinheim: Wiley-VCH, Março 2007.

- [12] **Metcalf, Robert L.** “Insect Control”. *Ullmann’s Encyclopedia of Industrial Chemistry, Electronic Release*. Weinheim: Wiley-VCH, Março 2007.
- [13] **Schnorbach, Hans-Jürgen; Matthaei, Hans-Detlef; Müller, Franz.** “Molluscicides”. *Ullmann’s Encyclopedia of Industrial Chemistry, Electronic Release*. Weinheim: Wiley-VCH, Março 2007.
- [14] **Harteig, Jürgen; Sommer, Hirbert; Müller Franz.** “Nematicides”. *Ullmann’s Encyclopedia of Industrial Chemistry, Electronic Release*. Weinheim: Wiley-VCH, Março 2007.
- [15] **University of Hertfordshire (2013).** *The Pesticides Properties DataBase (PPDB)*. Agriculture & Environment Research Unit (AERU), 2006-2013. [Última consulta a 08 de Janeiro de 2015] <http://sitem.herts.ac.uk.aeru/ppdb/en/index.htm> [páginas individuais referentes a cada pesticida]
- [16] **C D S Tomlin.** *The Pesticide Manual – a world Compendium, 11th Edition*. British Crop Protection Council, 1997. ISBN 1 901396 11 8.
- [17] **Wikipedia.** Wikipedia Foundation, Inc [Consultado a 02 de Dezembro de 2014] <http://www.wikipedia.org> [fonte das imagens de estruturas químicas apresentadas]
- [18] **Dr. Ehrenstorfer.** “SDS” – DVD de compilação de fichas MSDS de produtos. LGC Standards, GmbH, 2014.
- [19] **Harris, Daniel C.** *Quantitative Chemical Analysis*, 8th Edition. New York: W. H. Freeman and Company, 2010. ISBN 978 1 4292 1815 3.
- [20] *Esquema de um sistema de LC-MS/MS.* [Consultado a 26 Novembro 2014] http://muniche.linde.com/international/web/lg/spg/like35lgspg.nsf/docbyalias/image_hplc
- [21] *Esquema de um injetor de cromatografia gasosa.* [Consultado a 26 Novembro 2014] <http://teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry/tutorials/chrom/gaschrom.htm>
- [22] **Hoffmann, Edmond de; Stroobant, Vincent.** *Mass Spectrometry – Principles and Applications 3rd Edition*. John Wiley & Sons Ltd, 2007. ISBN 978 0 470 03310 4.
- [23] **Waters.** *Esquema do Sistema de MS/MS utilizado.* Acquity Ultra Performance LC®, Waters, Inc. -TQ Detector - MS Display
- [24] *Esquema de um quadrupolo.* [Consultado a 09 Dezembro 2014] http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422008000300030

- [25] *Esquema de um triplo quadrupolo*. [Consultado a 09 Dezembro 2014] <https://nationalmaglab.org/user-facilities/icr/techniques/tandem-ms>
- [26] **Waters**. “*Waters T Wave™*”. Waters Corporation. [Consultado a 08 Janeiro 2015] http://www.waters.com/waters/pt_PT/Travelling-wave-%28T-Wave%E2%84%A2%29-/nav.htm?cid=134663694
- [27] **Relacre**. *Guia Relacre 13 – Validação de métodos internos de ensaio em análise química*. Espaço 2 Gráfico, Fevereiro 2000. ISBN 972 8574 02 9
- [28] **EURACHEM / CITAC**. *EURACHEM / CITAC Guide GC 4 – Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, 3rd Edition*. 2012. 978 0 948926 30 3
- [29] **EURACHEM / Relacre**. *Guia EURACHEM / Relacre 1 – Exemplos de cálculos de incertezas, Edição 1*. Setembro de 2002
- [30] **Phenomenex**. “*SPE Reference Manual and Users Guide*”. [Última consulta a 19 de Dezembro de 2014] http://www.tecnocroma.pt/novidades/spe-user-guide-gu24131210_1.pdf
- [31] **Żwir-Ferenc, A.; Biziuk, M.** “*Solid Phase Extraction Technique – Trends, Opportunities and Applications*”, Polish Journal of Environmental Studies. Volume 15, Nº 5 (2006), pag 677-690.
- [32] **Lopes, Charlotte A.** Tese de Mestrado: “*Análise de cloroalcanos em água de consumo humano por LLE-GC-ECD*”, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. 2012.
- [33] **Gomes, Ana R.** Relatório de Estágio: “*Validação do Método de Ensaio para Análise de Hidrocarbonetos Totais em Águas por LLE-GC-FID*”, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. 2007.
- [34] **Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)**. “2001 Joint WHO/FAO Meeting on Pesticide Residues”, Geneva 20-29 de Setembro de 2001 [Consultado a 22 de Julho de 2014] http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Evaluation01/16_Thiodicarb.pdf
- [35] **Jones, Russell L.; Hunt, Timothy W.; Norris, Frank A.; Harden, Christal F.** “*Field research studies on the movement and degradation of thiodicarb and its metabolite methomyl*”, Journal of Contaminant Hydrology, volume 4, Setembro 1989, pag.359-371.

- [36] **Comissão Europeia.** “*EU Pesticides Database – European commission*”, [Última consulta a 17 de Dezembro de 2014] http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/?event=activesubstance.selection&language=N [páginas individuais referentes a cada pesticida]
- [37] **Merck.** Merck KGaA. [Última consulta a 16 de Dezembro de 2014] <http://www.merck.pt> [páginas individuais referentes às substâncias químicas utilizadas]
- [38] **Sigma-Aldrich.** Sigma-Aldrich Co. LLC. [Consulta a 10 de Julho de 2014] <http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=PT&language=pt&productNumber=34856&brand=SIAL&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Fisial%2F34856%3Flang%3Dpt> [ficha msds do diclorometano]

Anexo I Legislação

Apresenta-se de seguida um excerto da Diretiva 2013/39/EU, que define normas de qualidade ambiental (NQA) para substâncias consideradas como poluentes prioritários que devem de ser monitorizadas em água superficial (NQA-MA e NQA-CMA concentração em µg/l, NQA Biota em µg/kg peso húmido).

PT		Jornal Oficial da União Europeia					
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
N.º	Nome da substância	Número CAS ⁽⁹⁾	NQA-MA ⁽²⁾ Águas de superfície interiores ⁽¹⁾	NQA-MA ⁽²⁾ Outras águas de superfície	NQA-CMA ⁽⁴⁾ Águas de superfície interiores ⁽¹⁾	NQA-CMA ⁽⁴⁾ Outras águas de superfície	NQA Biota ⁽¹²⁾
(27)	Pentadorofenol	87-86-5	0,4	0,4	1	1	
(28)	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) ⁽¹³⁾	Não aplicável	Não aplicável	Não aplicável	Não aplicável	Não aplicável	
	Benzo(a)pireno	50-32-8	$1,7 \times 10^{-4}$	$1,7 \times 10^{-4}$	0,27	0,027	5
	Benzo(b)fluoranteno	205-99-2	Ver nota 11	Ver nota 11	0,017	0,017	Ver nota 11
	Benzo(k)fluoranteno	207-08-9	Ver nota 11	Ver nota 11	0,017	0,017	Ver nota 11
	Benzo(g,h,i)perileno	191-24-2	Ver nota 11	Ver nota 11	$8,2 \times 10^{-3}$	$8,2 \times 10^{-4}$	Ver nota 11
	Indeno(1,2,3-cd)pireno	193-39-5	Ver nota 11	Ver nota 11	Não aplicável	Não aplicável	Ver nota 11
(29)	Simazina	122-34-9	1	1	4	4	
(29-A)	Tetracloroetileno ⁽⁷⁾	127-18-4	10	10	Não aplicável	Não aplicável	
(29-B)	Tricloroetileno ⁽⁷⁾	79-01-6	10	10	Não aplicável	Não aplicável	
(30)	Compostos de tributestanho (catião tributestanho)	36643-28-4	0,0002	0,0002	0,0015	0,0015	
(31)	Triclorobenzenos	12002-48-1	0,4	0,4	Não aplicável	Não aplicável	
(32)	Triclorometano	67-66-3	2,5	2,5	Não aplicável	Não aplicável	
(33)	Trifluralina	1582-09-8	0,03	0,03	Não aplicável	Não aplicável	
(34)	Dicofol	115-32-2	$1,3 \times 10^{-3}$	$3,2 \times 10^{-5}$	Não aplicável ⁽¹⁰⁾	Não aplicável ⁽¹⁰⁾	33
(35)	Ácido perfluorooctanosulfónico e seus derivados (PFOS)	1763-23-1	$6,5 \times 10^{-4}$	$1,3 \times 10^{-4}$	36	7,2	9,1
(36)	Quinoxifena	12449-5-18-7	0,15	0,015	2,7	0,54	

Anexos

Continuação:

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
N.º	Nome da substância	Número CAS (1)	NQA-MA (2) Águas de superfície interiores (3)	NQA-MA (2) Outras águas de superfície	NQA-CMA (4) Águas de superfície interiores (3)	NQA-CMA (4) Outras águas de superfície	NQA Biota (12)
(37)	Dioxinas e compostos semelhantes a dioxinas	Ver nota de rodapé 10 do Anexo X da Diretiva 2000/60/CE			Não aplicável	Não aplicável	Soma PCDD + PCDF + PCB-DL 0,0065 µg.kg ⁻¹ TEQ (14)
(38)	Aclonifena	74070-46-5	0,12	0,012	0,12	0,012	
(39)	Cipermetrina	42576-02-3	0,012	0,0012	0,04	0,004	
(40)	Cibutrina	28159-98-0	0,0025	0,0025	0,016	0,016	
(41)	Cipermetrina	52315-07-8	8 × 10 ⁻⁵	8 × 10 ⁻⁶	6 × 10 ⁻⁴	6 × 10 ⁻⁵	
(42)	Diclorvos	62-73-7	6 × 10 ⁻⁴	6 × 10 ⁻⁵	7 × 10 ⁻⁴	7 × 10 ⁻⁵	
(43)	Hexabromociclododecano (HBCDD)	Ver nota de rodapé 12 do Anexo X da Diretiva 2000/60/CE	0,0016	0,0008	0,5	0,05	167
(44)	Heptacloro e heptacloro epóxido	76-44-8/ 1024-57-3	2 × 10 ⁻⁷	1 × 10 ⁻⁸	3 × 10 ⁻⁴	3 × 10 ⁻⁵	6,7 × 10 ⁻³
(45)	Terbutrina	886-50-0	0,065	0,0065	0,34	0,034	

Apresenta-se de seguida o Decreto-Lei N.º 306/2007 que estabelece os parâmetros de qualidade para água para consumo humano. (unidades em µg/l)

Parâmetro	Valor paramétrico	Unidade	Observações
Acetilamida	0,10	µg/l	V. n. 1.
Antimónio	5,0	µg/l Sb	
Arsénio	10	µg/l As	
Benzeno	1,0	µg/l	
Benzo(a)pireno	0,010	µg/l	
Boro	1,0	mg/l B	
Bromatos	25 (de 25 de Dezembro de 2003 até 25 de Dezembro de 2008). 10 (após 25 de Dezembro de 2008).	µg/l BrO ₃	V. n. 2.
Cádmio	5,0	µg/l Cd	
Crómio	50	µg/l Cr	V. n. 3.
Cobre	2,0	mg/l Cu	V. n. 3.
Cianetos	50	µg/l Cn	
1,2 dicloroetano	3,0	µg/l	
Epicloridrina	0,10	µg/l	V. n. 1.
Fluoretos	1,5	mg/l F	
Chumbo	25 (de 25 de Dezembro de 2003 até 25 de Dezembro de 2013). 10 (após 25 de Dezembro de 2013).	µg/l Pb	V. n. 3 e 4.
Mercúrio	1	µg/l Hg	
Níquel	20	µg/l Ni	V. n. 3.
Nitratos	50	mg/l NO ₃	V. n. 5.
Nitritos	0,5	mg/l NO ₂	V. n. 5.
Pesticida individual	0,10	µg/l	V. n. 6 e 7.

Anexo II Informação geral de cada pesticida, solvente e reagentes^{[15][18][36][37][38]}

Aclonifena

CAS nº: 74070-46-5

Formula Química: C₁₂H₉ClN₂O₃

Massa Molecular: 264,66 g/mol

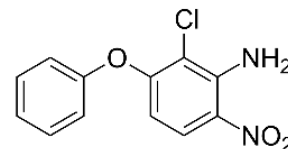
Grupo de substância: Éter Difenilico

Classe de Pesticida: Herbicida

Classificação segundo a WHO: U (improvável que cause perigo agudo)

Concentração máxima admissível em água: 0,12 µg/l (Diretiva Europeia 2013/39/EU de 12 de agosto de 2013); 0,1 µg/l (Decreto-Lei N° 306/2007 de 27 de agosto)

Aprovado para uso na **União Europeia** até **31/07/2019**; **Não Aprovado** para o uso em **Portugal**.



Estado físico: Pó amarelo

Temperatura de conservação do padrão comercial (°C): 20 ±4

Temperatura de fusão (°C): 81 - 82

Temperatura de ebulição (°C): Decompões antes da ebulição

Constante de dissociação (pKa) a 25 °C: -3,15

Solubilidade a 20 °C (mg/l)

- Água ultrapura: 1,4
- Metanol: 49200
- Acetona: 730000
- Diclorometano: -

Hazards & Precautions (H e P):

H410 Muito tóxico para os organismos aquáticos com efeitos duradouros.

P273 Evitar a libertação para o ambiente.

P391 Recolher o produto derramado.

P501 Eliminar o conteúdo/ recipiente em instalação aprovada de destruição de resíduos.

Evitar a libertação para o ambiente.



atenção

Persistência no meio aquático:

- Fotólise em água a pH = 7 (DT₅₀, dias): 197
- Hidrólise em água a pH = 7 (DT₅₀, dias): Estável
- Decomposição no sistema água-solo (DT₅₀, dias): 14,3
- Decomposição no sistema água-solo, apenas fase aquosa (DT₅₀, dias): 4,2

Azoxistrobina

CAS nº: 131860-33-8

Formula Química: C₂₂H₁₇N₃O₅

Massa Molecular: 403,4 g/mol

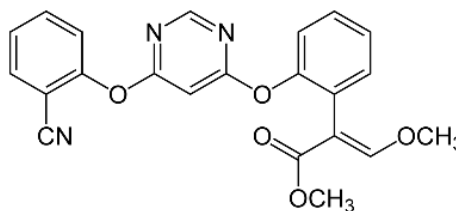
Grupo de substância: Estrobilurinas

Classe de Pesticida: Fungicida

Classificação segundo a WHO: U (improvável que cause perigo agudo)

Concentração máxima admissível em água: 0,1 µg/l (Decreto-Lei Nº 306/2007 de 27 de agosto)

Aprovado para uso na **União Europeia** até **31/12/2021**; **Aprovado** para o uso em **Portugal**.



Estado físico: Pó branco

Temperatura de conservação do padrão comercial (°C): 20 ±4

Temperatura de fusão (°C): 118 – 119

Temperatura de ebulição (°C): 360

Constante de dissociação (pKa) a 25 °C: - (Não se dissocia)

Solubilidade a 20 °C (mg/l):

- Água ultrapura: 6,7
- Metanol: 20000
- Acetona: 86000
- Diclorometano: Muito solúvel

Hazards & Precautions (H e P):

H331 Tóxico por inalação.

H410 Muito tóxico para os organismos aquáticos com efeitos duradouros.

P261 Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis.

P321 Tratamento específico (ver no presente rótulo).

P311 Contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.

P304+340 EM CASO DE INALAÇÃO: retirar a vítima para uma zona ao ar livre e mantê-la em repouso numa posição que não dificulte a respiração.

P405 Armazenar em local fechado à chave.

P501 Eliminar o conteúdo/ recipiente em instalação aprovada de destruição de resíduos. Evitar a libertação para o ambiente.

Persistência no meio aquático:

- Fotólise em água a pH = 7 (DT₅₀, dias): 8,7
- Hidrólise em água a pH = 7 (DT₅₀, dias): Estável
- Decomposição no sistema água-solo (DT₅₀, dias): 205
- Decomposição no sistema água-solo, apenas fase aquosa (DT₅₀, dias): 6,1



Bifenox

CAS nº: 42576-02-3

Formula Química: C₁₄H₉Cl₂NO₅

Massa Molecular: 342,1 g/mol

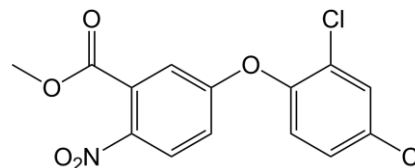
Grupo de substância: Éter Difenílico

Classe de Pesticida: Herbicida

Classificação segundo a WHO: U (improvável que cause perigo agudo)

Concentração máxima admissível em água: 0,012 µg/l (Diretiva Europeia 2013/39/EU de 12 de agosto de 2013)

Aprovado para uso na **União Europeia** até **31/12/2018**; **Não Aprovado** para o uso em **Portugal**.



Estado físico: Líquido amarelo pálido

Temperatura de conservação do padrão comercial (°C): 20 ±4

Temperatura de fusão (°C): 87

Temperatura de ebulição (°C): Decompões antes da ebulição

Constante de dissociação (pKa) a 25 °C: - (Não se dissocia)

Solubilidade a 20 °C (mg/l):

- Água ultrapura: 0,1
- Metanol: 23000
- Acetona: 400 g/kg
- Diclorometano: 1000000

Hazards & Precautions (H e P):

H410 Muito tóxico para os organismos aquáticos com efeitos duradouros.

P273 Evitar a libertação para o ambiente.

P391 Recolher o produto derramado.

P501 Eliminar o conteúdo/ recipiente em instalação aprovada de destruição de resíduos.

Evitar a libertação para o ambiente.

Persistência no meio aquático:

- Fotólise em água a pH = 7 (DT₅₀, dias): 2,2
- Hidrólise em água a pH = 7 (DT₅₀, dias): 265 (pH = 7); 4 (pH = 9)
- Decomposição no sistema água-solo (DT₅₀, dias): 0,11
- Decomposição no sistema água-solo, apenas fase aquosa (DT₅₀, dias): -



Atenção

Cipermetrina

CAS Nº: 52315-07-8

Formula química: C₂₂H₁₉C₁₂NO₃

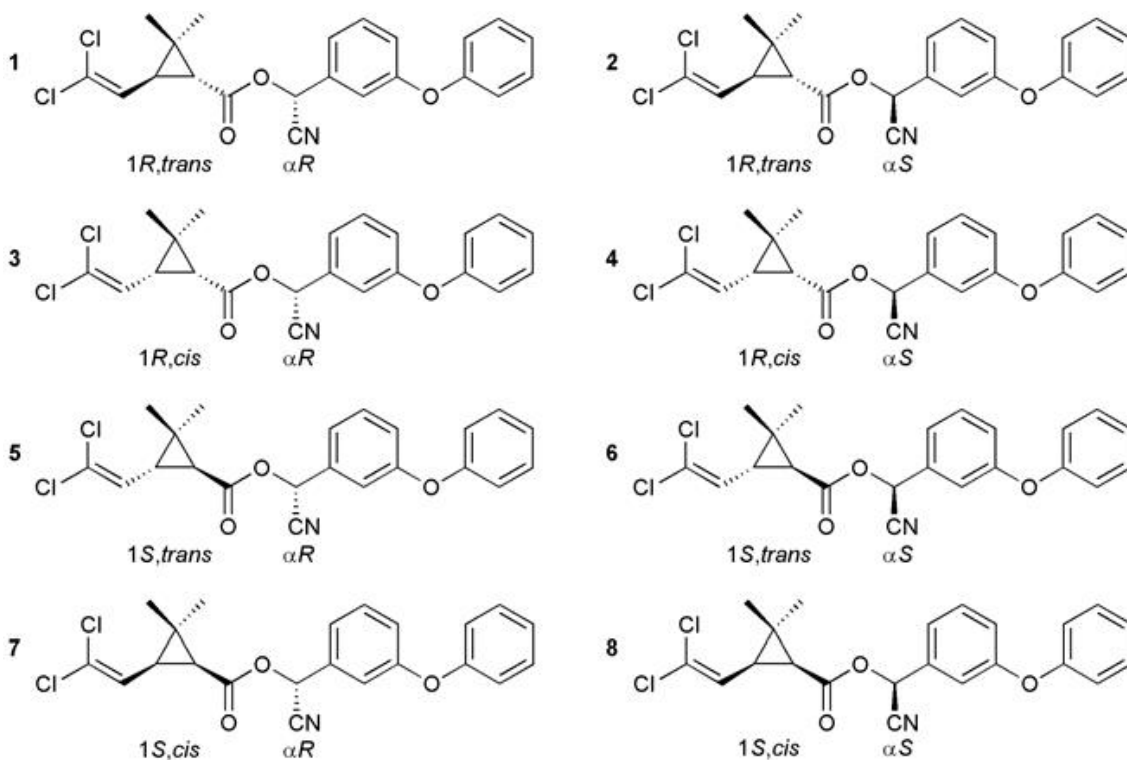
Massa Molecular: 416,30 g/mol

Grupo de substância: Piretróides

Classe de Pesticida: Inseticida, medicina veterinária

Concentração total máxima admissível em água: 6×10^{-4} µg/l (Diretiva Europeia 2013/39/EU de 12 de agosto de 2013)

Aprovado para uso na **União Europeia** até **31/10/2017**; **Aprovado** para o uso em **Portugal**.



Anexos

alfa-Cipermetrina

Composição isomérica: Mistura racémica dos isómeros 4 e 7.

CAS Nº: 67375-30-8

Classificação segundo a WHO: II (moderadamente perigoso)

Aprovado para uso na **União Europeia** até **31/07/2017**; **Aprovado** para o uso em **Portugal**.

Estado físico: Pó branco

Temperatura de conservação do padrão comercial (°C): 20 ±4

Temperatura de fusão (°C): 78 – 81

Temperatura de ebulição (°C): Decompões antes da ebulição

Constante de dissociação (pKa) a 25 °C: 5

Solubilidade a 20 °C (mg/l):

- Água ultrapura: 0,004 – 0,01
- Metanol: 21300
- Acetona: 620000
- Diclorometano: 550000

Hazards & Precautions (H e P):

H301 Tóxico por ingestão.

H335 Pode provocar irritação das vias respiratórias.

H373 Pode afectar os órgãos após exposição prolongada ou repetida.

H410 Muito tóxico para os organismos aquáticos com efeitos duradouros.

P260 Não respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis.

P261 Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis.

P301+P310 EM CASO DE INGESTÃO: contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.

P321 Tratamento específico (ver no presente rótulo).

P405 Armazenar em local fechado à chave.

P501 Eliminar o conteúdo/ recipiente em instalação aprovada de destruição de resíduos. Evitar a libertação para o ambiente.

Persistência no meio aquático:

- Fotólise em água a pH = 7 (DT₅₀, dias): -
- Hidrólise em água a pH = 7 (DT₅₀, dias): 101 (sensível ao pH, estável a pH = 4, 7,3 dias a pH = 9)
- Decomposição no sistema água-solo (DT₅₀, dias): 21
- Decomposição no sistema água-solo, apenas fase aquosa (DT₅₀, dias): 1,3



Anexos

beta-Cipermetrina

Composição isomérica: 2 pares enantioméricos na proporção 2:3, isómeros 4 e 7 com isómeros 2 e 5.

CAS Nº: 72204-43-4 (ou 65731-84-2)

Classificação segundo a WHO: NL (não listado)

Aguardando aprovação para uso na União Europeia; Não Aprovado para o uso em Portugal.

Estado físico: Pó branco

Temperatura de conservação do padrão comercial (°C): 20 ±4

Temperatura de fusão (°C): 64 – 71

Temperatura de ebulição (°C): 253

Constante de dissociação (pKa) a 25 °C: - (Não se dissocia)

Solubilidade a 20 °C (mg/l):

- Água ultrapura: 0,9
- Metanol: 45000
- Acetona: 2102000
- Diclorometano: 3878000

Hazards & Precautions (H e P):

H302+H332 Nocivo por ingestão ou inalação.

H335 Pode provocar irritação das vias respiratórias.

H410 Muito tóxico para os organismos aquáticos com efeitos duradouros.

P261 Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis.

P301+P312 EM CASO DE INGESTÃO: caso sinta indisposição, contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.

P304+P340 EM CASO DE INALAÇÃO: retirar a vítima para uma zona ao ar livre e mantê-la em repouso numa posição que não dificulte a respiração.

P312 Caso sinta indisposição, contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.

P405 Armazenar em local fechado à chave.

P501 Eliminar o conteúdo/ recipiente em instalação aprovada de destruição de resíduos. Evitar a libertação para o ambiente.

Persistência no meio aquático:

- Fotólise em água a pH = 7 (DT₅₀, dias): -
- Hidrólise em água a pH = 7 (DT₅₀, dias): -
- Decomposição no sistema água-solo (DT₅₀, dias): 22,2
- Decomposição no sistema água-solo, apenas fase aquosa (DT₅₀, dias): -



Anexos

teta-Cipermetrina

Composição isomérica: Mistura racémica dos isómeros 2 e 5.

CAS Nº: 71697-59-1

Classificação segundo a WHO: NL (não listado)

Não Listado para uso na **União Europeia**; **Não Aprovado** para o uso em **Portugal**.

Estado físico: solução em ciclohexano

Temperatura de conservação do padrão comercial (°C): 20 (no escuro)

Temperatura de fusão (°C): 81 – 85

Temperatura de ebulição (°C): -

Constante de dissociação (pKa) a 25 °C: - (Não se dissocia)

Solubilidade a 25 °C (mg/l):

- Água ultrapura: < 0,1
- Metanol: -
- Acetona: -
- Diclorometano: -

Hazards & Precautions (H e P):

H332 Nocivo por inalação.

H302 Nocivo por ingestão.

H335 Pode provocar irritação das vias respiratórias.

H410 Muito tóxico para os organismos aquáticos com efeitos duradouros.

P261 Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis.

P501 Eliminar o conteúdo/ recipiente em instalação aprovada de destruição de resíduos. Evitar a libertação para o ambiente.



Persistência no meio aquático:

- Fotólise em água a pH = 7 (DT₅₀, dias): -
- Hidrólise em água a pH = 7 (DT₅₀, dias): -
- Decomposição no sistema água-solo (DT₅₀, dias): -
- Decomposição no sistema água-solo, apenas fase aquosa (DT₅₀, dias): -

Anexos

zeta-Cipermetrina

Composição Isomérica: composta pelos 4 α -esterioisómeros do carbono α -ciano

CAS Nº: 1315501-18-8 (ou 52315-07-8)

Classificação segundo a WHO: Ib (altamente perigoso)

Aprovado para uso na **União Europeia** até **30/11/2019**; **Não Aprovado** para o uso em **Portugal**.

Estado físico: Líquido amarelo pálido viscoso.

Temperatura de conservação do padrão comercial (°C): 20 \pm 4

Temperatura de fusão (°C): 60 – 80^[18]; (-3)^[15]

Temperatura de ebulição (°C): 360

Constante de dissociação (pKa) a 25 °C: - (Não se dissocia)

Solubilidade a 20 °C (mg/l):

- Água ultrapura: 0,039
- Metanol: 1000000
- Acetona: 1000000
- Diclorometano: 1000000

Hazards & Precautions (H e P):

H302+H332 Nocivo por ingestão ou inalação.

H335 Pode provocar irritação das vias respiratórias.

H410 Muito tóxico para os organismos aquáticos com efeitos duradouros.

P261 Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis.

P301+P312 EM CASO DE INGESTÃO: caso sinta indisposição, contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.

P304+P340 EM CASO DE INALAÇÃO: retirar a vítima para uma zona ao ar livre e mantê-la em repouso numa posição que não dificulte a respiração.

P312 Caso sinta indisposição, contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.

P405 Armazenar em local fechado à chave.

P501 Eliminar o conteúdo/ recipiente em instalação aprovada de destruição de resíduos. Evitar a libertação para o ambiente.

Persistência no meio aquático:

- Fotólise em água a pH = 7 (DT₅₀, dias): 3,05
- Hidrólise em água a pH = 7 (DT₅₀, dias): 25 (sensível ao pH, estável a pH = 5, variável a pH = 9)
- Decomposição no sistema água-solo (DT₅₀, dias): 2
- Decomposição no sistema água-solo, apenas fase aquosa (DT₅₀, dias): 0,1



Dicofol

CAS nº: 115-32-2

Formula Química: C₁₄H₉Cl₅O

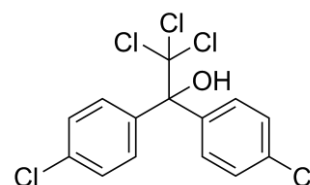
Massa Molecular: 370,49 g/mol

Grupo de substância: Acaricida

Classe de Pesticida: Organoclorados

Classificação segundo a WHO: II (moderadamente perigoso)

Concentração máxima admissível em água: 1,3 × 10⁻³ µg/l (Diretiva Europeia 2013/39/EU de 12 de agosto de 2013)



Não Aprovado para uso na **União Europeia**; **Não Aprovado** para o uso em **Portugal**.

Estado físico: Líquido castanho

Temperatura de conservação do padrão comercial (°C): 20 ±4

Temperatura de fusão (°C): 78,5 – 79,5

Temperatura de ebulição (°C): Sublima a 193

Constante de dissociação (pKa) a 25 °C: -

Solubilidade a 20 °C (mg/l):

- Água ultrapura: 0,8
- Metanol: 2750000
- Acetona: 400000
- Diclorometano: 2600000

Hazards & Precautions (H e P):

H302 Nocivo por ingestão.

H312 Nocivo em contacto com a pele.

H315 Provoca irritação cutânea.

H317 Pode provocar uma reação alérgica cutânea.

H410 Muito tóxico para os organismos aquáticos com efeitos duradouros.

P261 Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis.

P280 Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial.

P321 Tratamento específico (ver no presente rótulo).

P322 Medidas específicas (ver no presente rótulo).

P362 Retirar a roupa contaminada e lavá-la antes de a voltar a usar.

P501 Eliminar o conteúdo/ recipiente em instalação aprovada de destruição de resíduos. Evitar a libertação para o ambiente.



Persistência no meio aquático:

- Fotólise em água a pH = 7 (DT₅₀, dias): 26
- Hidrólise em água a pH = 7 (DT₅₀, dias): 3,3 (sensível ao pH, 80 dias a pH = 5, 26 minutos a pH =9)
- Decomposição no sistema água-solo (DT₅₀, dias): 29
- Decomposição no sistema água-solo, apenas fase aquosa (DT₅₀, dias): -

Etoprofos

CAS nº: 13194-48-4

Formula Química: C₈H₁₉O₂PS₂

Massa Molecular: 242,30 g/mol

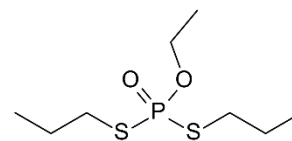
Grupo de substância: Organofosforados

Classe de Pesticida: Inseticida, Nematocida

Classificação segundo a WHO: Ia (extremamente perigoso)

Concentração máxima admissível em água: 0,1 µg/l (Decreto-Lei N° 306/2007 de 27 de agosto)

Aprovado para uso na **União Europeia** até **30/09/2017**; **Aguardando Aprovação** para o uso em **Portugal**.



Estado físico: Líquido amarelo pálido

Temperatura de conservação do padrão comercial (°C): 4 ±4

Temperatura de fusão (°C): 70

Temperatura de ebulição (°C): Decompões antes da ebulição

Constante de dissociação (pKa) a 25 °C: - (Não se dissocia)

Solubilidade a 20 °C (mg/l):

- Água ultrapura: 1300
- Metanol: 500000
- Acetona: 500000
- Diclorometano: -

Hazards & Precautions (H e P):

H301 Tóxico por ingestão.

H310 Mortal em contacto com a pele.

H330 Mortal por inalação.

H317 Pode provocar uma reação alérgica cutânea.

H410 Muito tóxico para os organismos aquáticos com efeitos duradouros.

P301+P310 EM CASO DE INGESTÃO: contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.

P310 Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.

P320 É urgente um tratamento específico (ver no presente rótulo).

P361 Despir/retirar imediatamente toda a roupa contaminada.

P405 Armazenar em local fechado à chave.

P501 Eliminar o conteúdo/ recipiente em instalação aprovada de destruição de resíduos. Evitar a libertação para o ambiente.

Persistência no meio aquático:

- Fotólise em água a pH = 7 (DT₅₀, dias): Estável
- Hidrólise em água a pH = 7 (DT₅₀, dias): Estável (sensível ao pH, 83 dias a pH = 9)
- Decomposição no sistema água-solo (DT₅₀, dias): 83
- Decomposição no sistema água-solo, apenas fase aquosa (DT₅₀, dias): 20



Iprodiona

CAS nº: 36734-19-7

Formula Química: C₁₃H₁₃Cl₂N₃O₃

Massa Molecular: 330,17 g/mol

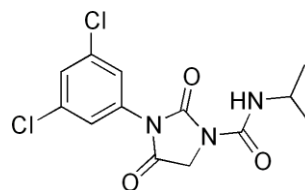
Grupo de substância: Dicarboximidas

Classe de Pesticida: Fungicida

Classificação segundo a WHO: III (ligeiramente perigoso)

Concentração máxima admissível em água: 0,1 µg/l (Decreto-Lei N° 306/2007 de 27 de agosto)

Aprovado para uso na **União Europeia** até **31/10/2016**; **Aprovação** para o uso em **Portugal**.



Estado físico: pó branco

Temperatura de conservação do padrão comercial (°C): 20 ±4

Temperatura de fusão (°C): 134

Temperatura de ebulição (°C): -

Constante de dissociação (pKa) a 25 °C: - (Não se dissocia)

Solubilidade a 20 °C (mg/l):

- Água ultrapura: 12,2
- Metanol: -
- Acetona: 342000
- Diclorometano: 450000

Hazards & Precautions (H e P):

H351 Suspeito de provocar cancro.

H410 Muito tóxico para os organismos aquáticos com efeitos duradouros.

P201 Pedir instruções específicas antes da utilização.

P273 Evitar a libertação para o ambiente.

P281 Usar o equipamento de proteção individual exigido.

P308+313 EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: consulte um médico.

P391 Recolher o produto derramado.

P405 Armazenar em local fechado à chave.

P501 Eliminar o conteúdo/ recipiente em instalação aprovada de destruição de resíduos. Evitar a libertação para o ambiente.

Persistência no meio aquático:

- Fotólise em água a pH = 7 (DT₅₀, dias): 67 (sensível ao pH, 67 dias a pH = 5, 1 hora a pH = 9)
- Hidrólise em água a pH = 7 (DT₅₀, dias): 3 (sensível ao pH, 146 dias a pH = 5, 0,2 dias a pH = 8)
- Decomposição no sistema água-solo (DT₅₀, dias): 30
- Decomposição no sistema água-solo, apenas fase aquosa (DT₅₀, dias): 30



Metomil

CAS nº: 16752-77-5

Formula Química: C₅H₁₀N₂O₂S

Massa Molecular: 162,21 g/mol

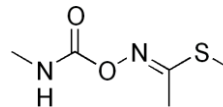
Grupo de substância: Carbamatos

Classe de Pesticida: Inseticida, Acaricida, Metabolito

Classificação segundo a WHO: Ib (altamente perigoso)

Concentração máxima admissível em água: 0,1 µg/l (Decreto-Lei Nº 306/2007 de 27 de agosto)

Aprovado para uso na **União Europeia** até **31/08/2018**; **Aprovação** para o uso em **Portugal**.



Estado físico: pó branco

Temperatura de conservação do padrão comercial (°C): 20 ±4

Temperatura de fusão (°C): 78 – 79

Temperatura de ebulição (°C): Decompões antes da ebulição

Constante de dissociação (pKa) a 25 °C: - (Não se dissocia)

Solubilidade a 20 °C (mg/l):

- Água ultrapura: 55000
- Metanol: 1000000
- Acetona: 250000
- Diclorometano: 1000 g/kg

Hazards & Precautions (H e P):

H300 Mortal por ingestão.

H410 Muito tóxico para os organismos aquáticos com efeitos duradouros.

P273 Evitar a libertação para o ambiente.

P264 Lavar as mãos cuidadosamente após manuseamento.

P301+P310 EM CASO DE INGESTÃO: contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.

P321 Tratamento específico (ver no presente rótulo).

P405 Armazenar em local fechado à chave.

P501 Eliminar o conteúdo/ recipiente em instalação aprovada de destruição de resíduos. Evitar a libertação para o ambiente.

Persistência no meio aquático:

- Fotólise em água a pH = 7 (DT₅₀, dias): Estável
- Hidrólise em água a pH = 7 (DT₅₀, dias): Estável (sensível ao pH, 36 dias a pH =9)
- Decomposição no sistema água-solo (DT₅₀, dias): 3,7
- Decomposição no sistema água-solo, apenas fase aquosa (DT₅₀, dias): 2,9



Ometoato

CAS nº: 1113-02-6

Formula Química: C₅H₁₂NO₄PS

Massa Molecular: 213,2 g/mol

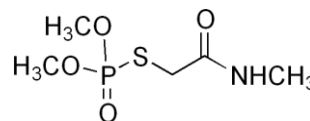
Grupo de substância: Organofosforados

Classe de Pesticida: Inseticida, Acaricida, Metabolito

Classificação segundo a WHO: Ib (altamente perigoso)

Concentração máxima admissível em água: 0,1 µg/l (Decreto-Lei N° 306/2007 de 27 de agosto)

Não Aprovado para uso na **União Europeia**; **Não Aprovação** para o uso em **Portugal**.



Estado físico: Líquido incolor

Temperatura de conservação do padrão comercial (°C): 4 ±4

Temperatura de fusão (°C): -28

Temperatura de ebulição (°C): 128 (Sublima); Decompões antes da ebulição.

Constante de dissociação (pKa) a 25 °C: -

Solubilidade a 20 °C (mg/l):

- Água ultrapura: 10000
- Metanol: muito solúvel
- Acetona: muito solúvel
- Diclorometano: muito solúvel

Hazards & Precautions (H e P):

H301 Tóxico por ingestão.

H312 Nocivo em contacto com a pele.

H400 Muito tóxico para os organismos aquáticos.

P280 Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial.

P301+P310 EM CASO DE INGESTÃO: contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.

P321 Tratamento específico (ver no presente rótulo).

P322 Medidas específicas (ver no presente rótulo).

P405 Armazenar em local fechado à chave.

P501 Eliminar o conteúdo/ recipiente em instalação aprovada de destruição de resíduos. Evitar a libertação para o ambiente.

Persistência no meio aquático:

- Fotólise em água a pH = 7 (DT₅₀, dias): Estável
- Hidrólise em água a pH = 7 (DT₅₀, dias): 17
- Decomposição no sistema água-solo (DT₅₀, dias): 4,5
- Decomposição no sistema água-solo, apenas fase aquosa (DT₅₀, dias): -



Quinoxifena

CAS nº: 124495-18-7

Formula Química: C₁₅H₈Cl₂FNO

Massa Molecular: 308,13 g/mol

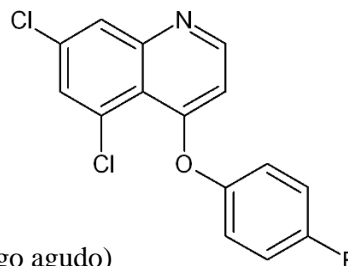
Grupo de substância: Quinolina

Classe de Pesticida: Fungicida

Classificação segundo a WHO: U (improvável que cause perigo agudo)

Concentração máxima admissível em água: 2,7 µg/l (Diretiva Europeia 2013/39/EU de 12 de agosto de 2013); 0,1 µg/l (Decreto-Lei N° 306/2007 de 27 de agosto)

Aprovado para uso na **União Europeia** até **31/04/2017**; **Aprovação** para o uso em **Portugal**.



Estado físico: Pó branco

Temperatura de conservação do padrão comercial (°C): 20 ±4

Temperatura de fusão (°C): 106 – 107,5

Temperatura de ebulição (°C): -

Constante de dissociação (pKa) a 25 °C: - (Não se dissocia)

Solubilidade a 20 °C (mg/l):

- Água ultrapura: 0,047
- Metanol: 21500
- Acetona: 116000
- Diclorometano: -

Hazards & Precautions (H e P):

H317 Pode provocar uma reação alérgica cutânea.

H410 Muito tóxico para os organismos aquáticos com efeitos duradouros.

P261 Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis.

P280 Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial.

P273 Evitar a libertação para o ambiente.

P321 Tratamento específico (ver no presente rótulo).

P363 Lavar a roupa contaminada antes de a voltar a usar.

P501 Eliminar o conteúdo/ recipiente em instalação aprovada de destruição de resíduos. Evitar a libertação para o ambiente.

Persistência no meio aquático:

- Fotólise em água a pH = 7 (DT₅₀, dias): 0,8
- Hidrólise em água a pH = 7 (DT₅₀, dias): Estável (sensível à temperatura e pH, 75 dias a pH = 5 a 25 °C, 7 dias a pH 5 e 50 °C)
- Decomposição no sistema água-solo (DT₅₀, dias): 127
- Decomposição no sistema água-solo, apenas fase aquosa (DT₅₀, dias): 5



Terbutrina

CAS nº: 886-50-0

Formula Química: C₁₀H₁₉N₅S

Massa Molecular: 241,36 g/mol

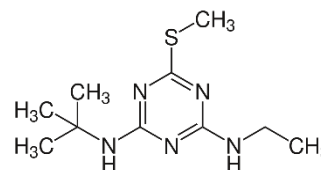
Grupo de substância: Triazinas

Classe de Pesticida: Herbicida

Classificação segundo a WHO: III (ligeiramente perigoso)

Concentração máxima admissível em água: 0,34 µg/l (Diretiva Europeia 2013/39/EU de 12 de agosto de 2013); 0,1 µg/l (Decreto-Lei N° 306/2007 de 27 de agosto)

Não Aprovado para uso na **União Europeia**; **Não Aprovação** para o uso em **Portugal**.



Estado físico: Pó branco

Temperatura de conservação do padrão comercial (°C): 20 ±4

Temperatura de fusão (°C): 104 – 105

Temperatura de ebulição (°C): 274 a 101 kPa

Constante de dissociação (pKa) a 25 °C: 4,3

Solubilidade a 20 °C (mg/l):

- Água ultrapura: 25
- Metanol: 220000
- Acetona: 220000
- Diclorometano: -

Hazards & Precautions (H e P):

H319 Provoca irritação ocular grave.

H410 Muito tóxico para os organismos aquáticos com efeitos duradouros.

P280 Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial.

P273 Evitar a libertação para o ambiente.

P264 Lavar as mãos cuidadosamente após manuseamento.

P305+P351+P338 SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar.

P337+P313 Caso a irritação ocular persista: consulte um médico.

P501 Eliminar o conteúdo/ recipiente em instalação aprovada de destruição de resíduos. Evitar a libertação para o ambiente.

Persistência no meio aquático:

- Fotólise em água a pH = 7 (DT₅₀, dias): 0,5
- Hidrólise em água a pH = 7 (DT₅₀, dias): Estável
- Decomposição no sistema água-solo (DT₅₀, dias): 60
- Decomposição no sistema água-solo, apenas fase aquosa (DT₅₀, dias): 27



Tiodicarbe

CAS nº: 59669-26-0

Formula Química: C₁₀H₁₈N₄O₄S₃

Massa Molecular: 354,47 g/mol

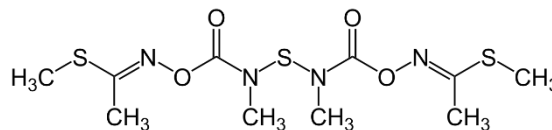
Grupo de substância: Carbamatos

Classe de Pesticida: Inseticida, Acaricida, Ovicida

Classificação segundo a WHO: II (moderadamente perigoso)

Concentração máxima admissível em água: 0,1 µg/l (Decreto-Lei Nº 306/2007 de 27 de agosto)

Não Aprovado para uso na **União Europeia**; **Não Aprovação** para o uso em **Portugal**.



Estado físico: Pó branco

Temperatura de conservação do padrão comercial (°C): 20 ±4

Temperatura de fusão (°C): 172,6

Temperatura de ebulição (°C): Decompões antes da ebulição

Constante de dissociação (pKa) a 25 °C: - (Não se dissocia)

Solubilidade a 20 °C (mg/l):

- Água ultrapura: 22,2
- Metanol: 5 g/kg
- Acetona: 5330
- Diclorometano: 150 g/kg

Hazards & Precautions (H e P):

H301 Tóxico por ingestão.

H330 Mortal por inalação.

H400 Muito tóxico para os organismos aquáticos.

P260 Não respirar as poeiras/ fumos/ gases/ névoas/ vapores/ aerossóis.

P273 Evitar a libertação para o ambiente.

P284 Usar proteção respiratória.

P310 Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.



Persistência no meio aquático:

- Fotólise em água a pH = 7 (DT₅₀, dias): 9
- Hidrólise em água a pH = 7 (DT₅₀, dias): 30,8 (sensível ao pH, 69,1 dias a pH 5, 0,26 dias a pH 9)
- Decomposição no sistema água-solo (DT₅₀, dias): 0.05
- Decomposição no sistema água-solo, apenas fase aquosa (DT₅₀, dias): -

Acetona

CAS: 67-64-1

Formula química: CH₃COCH₃

Massa molecular: 58,08 g/mol

Densidade: 0,79 g/cm³ a 20 °C

Ponto de ebulição: 56,2 °C a 1.013 hPa

Hazards & Precautions (H e P):

H225 Líquido e vapor facilmente inflamáveis.

H319 Provoca irritação ocular grave.

H336 Pode provocar sonolência ou vertigens.

EUH066 Pode provocar pele seca ou gretada, por exposição repetida.



Ácido fórmico

CAS: 64-18-6

Formula química: HCOOH

Massa molecular: 46,03 g/mol

Hazards & Precautions (H e P):

H226 Líquido e vapor inflamáveis.

H290 Pode ser corrosivo para os metais.

H314 Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves.

P210 Manter afastado do calor.

P280 Usar luvas de protecção/ vestuário de protecção/ protecção ocular/ protecção facial.

P301+P330+P331 EM CASO DE INGESTÃO: enxaguar a boca. NÃO provocar o vômito.

P305+P351+P338 SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar.

P308+P310 EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.



Acetato de amónio

CAS: 631-61-8

Formula química: CH₃COONH₄

Massa molecular: 77,08 g/mol

Hazards & Precautions (H e P):

Substância não considerada como perigosa de acordo com GHS.

Anexos

Cobre em pó

CAS: 7440-50-8

Formula química: Cu

Massa molecular: 63,55 g/mol

Tamanho de partícula: < 63 µm

Hazards & Precautions (H e P):

P260 Não respirar as poeiras.

Não é uma substância ou mistura perigosa de acordo com o Regulamento (CE) No. 1272/2008

Diclorometano

CAS: 75-09-2

Formula química: CH₂Cl₂

Massa molecular: 84,93 g/mol

Densidade: 1,325 g/cm³ a 25 °C (literatura)

Ponto de ebulição: 39,8 - 40 °C

Hazards & Precautions (H e P):

H315 Provoca irritação cutânea.

H319 Provoca irritação ocular grave.

H335 Pode provocar irritação das vias respiratórias.

H336 Pode provocar sonolência ou vertigens.

H351 Suspeito de provocar cancro.

H373 Pode afectar os órgãos após exposição prolongada ou repetida.

P261 Evitar respirar os vapores.

P281 Usar o equipamento de protecção individual exigido.

P305+P351+P338 SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar.



Florisol

CAS: 1343-88-0

Natureza química: Silicato de magnésio

Tamanho de partícula: 0,150 – 0,250 µm

Hazards & Precautions (H e P):

Não é uma substância ou mistura perigosa de acordo com o Regulamento (CE) No. 1272/2008

Lã de vidro

Hazards & Precautions (H e P) de acordo com o rótulo:

H332 Nocivo por inalação.

Pode provocar irritação dos olhos e/ou pele.

n-Hexano

CAS: 110-54-3

Formula química: $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$

Massa molecular: 86,18 g/mol

Densidade: 0,66 g/cm³ a 20 °C

Ponto de ebulição: 69 °C a 1.013 hPa

Hazards & Precautions (H e P):

H225 Líquido e vapor facilmente inflamáveis.

H304 Pode ser letal por ingestão e penetração nas vias respiratórias.

H315 Provoca irritação cutânea.

H336 Pode provocar sonolência ou vertigens.

H361f Suspeito de afectar a fertilidade.

H373 Pode afectar os órgãos após exposição prolongada ou repetida.

H411 Tóxico para os organismos aquáticos com efeitos duradouros.

P210 Manter afastado do calor, superfícies quentes, faíscas, chama aberta ou outras fontes de ignição. Não fumar.

P240 Ligação à terra/ equipotencial do recipiente e do equipamento receptor.

P273 Evitar a libertação para o ambiente.

P301+P310 EM CASO DE INGESTÃO: contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.

P302+P352 SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar abundantemente com sabonete e água.

P331 NÃO provocar o vômito.

P403+P235 Armazenar em local bem ventilado. Conservar em ambiente fresco.



Metanol

CAS: 67-56-1

Formula química: CH₃OH

Massa molecular: 32,04 g/mol

Densidade: 0,792 g/cm³ a 20 °C

Ponto de ebulição: 64,5 °C a 1.013 hPa

Miscibilidade em água: 100 % (w/w)



Hazards & Precautions (H e P):

H225 Líquido e vapor facilmente inflamáveis.

H301+H311+H331 Tóxico por ingestão, contacto com a pele ou inalação

H370 Afecta os órgãos (Olhos).

P210 Manter afastado do calor, superfícies quentes, faísca, chama aberta e outras fontes de ignição. Não fumar.

P233 Manter o recipiente bem fechado.

P280 Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial.

P302+P352 SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar abundantemente com sabonete e água.

P304+P340 EM CASO DE INALAÇÃO: retirar a vítima para uma zona ao ar livre e mantê-la em repouso numa posição que não dificulte a respiração.

P308+P310 EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.

P403+P235 Armazenar em local bem ventilado. Conservar em ambiente fresco.

P210 Manter afastado do calor, superfícies quentes, faísca, chama aberta e outras fontes de ignição. Não fumar.

P233 Manter o recipiente bem fechado.

P305+P351+P338 SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar.

Sulfato de sódio anidro

CAS: 7757-82-6

Formula química: Na₂SO₄

Massa molecular: 142,04 g/mol

Hazards & Precautions (H e P):

Substância não considerada como perigosa de acordo com GHS.

Anexos

Tiosulfato de sódio pentahidratado

CAS: 10102-17-7

Formula química: $\text{Na}_2\text{O}_3\text{S}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Massa molecular: 248,21 g/mol

Hazards & Precautions (H e P):

Substância não considerada como perigosa de acordo com GHS.

Anexo III Espectros de massa dos iões selecionados para o modo de MRM

Apresentam-se de seguida os espectros de massa correspondentes à otimização das condições de MRM apenas para os 6 pesticidas que fazem parte do grupo final validado.

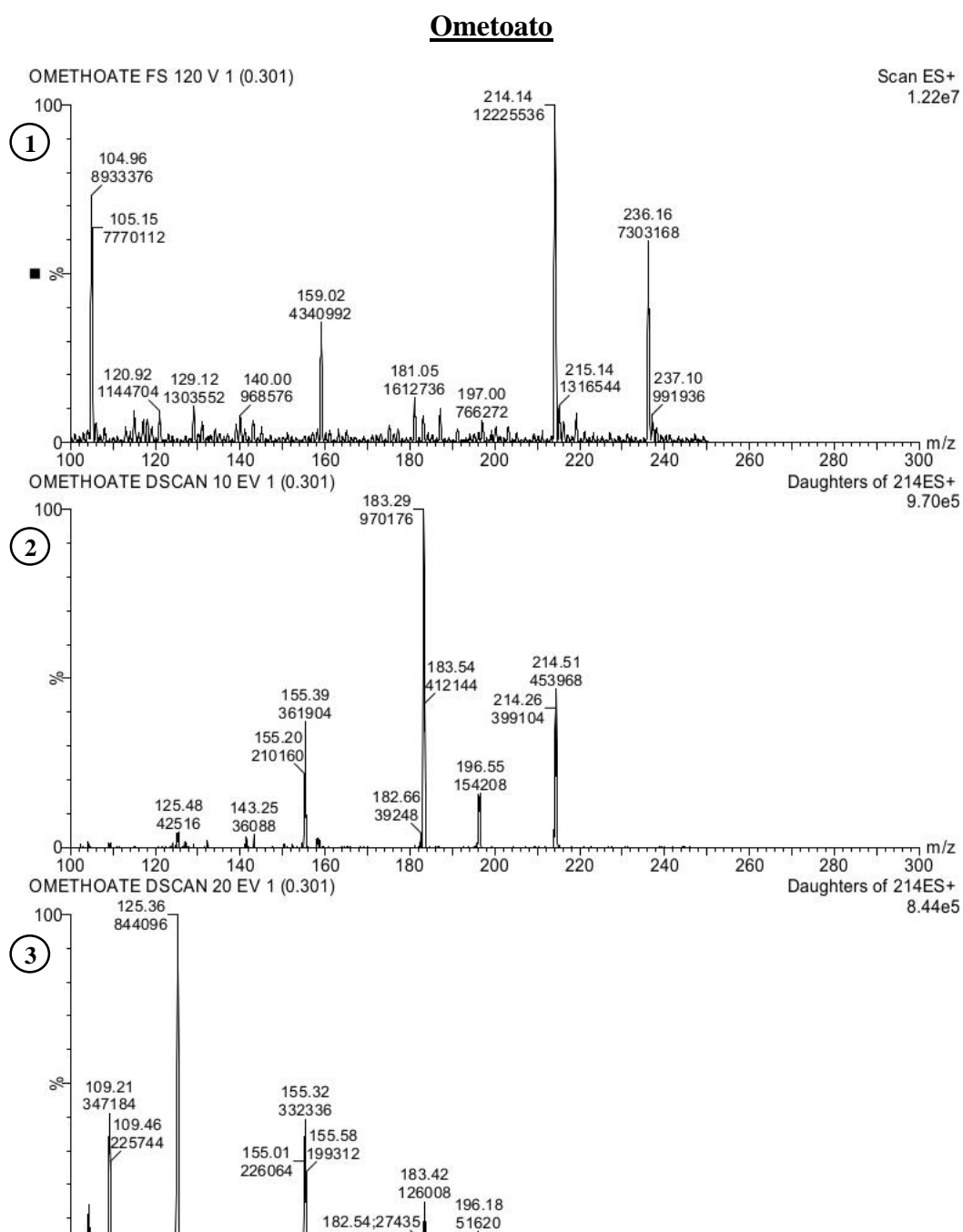


Figura III.1: Espectros de massa do pesticida ometoato. 1) Espectro de massa em modo de full scan obtido durante a otimização da voltagem de cone; 2 e 3) espectros de massa em modo Daughter Scan para a transição de quantificação (MRM1) e confirmação (MRM2) respetivamente.

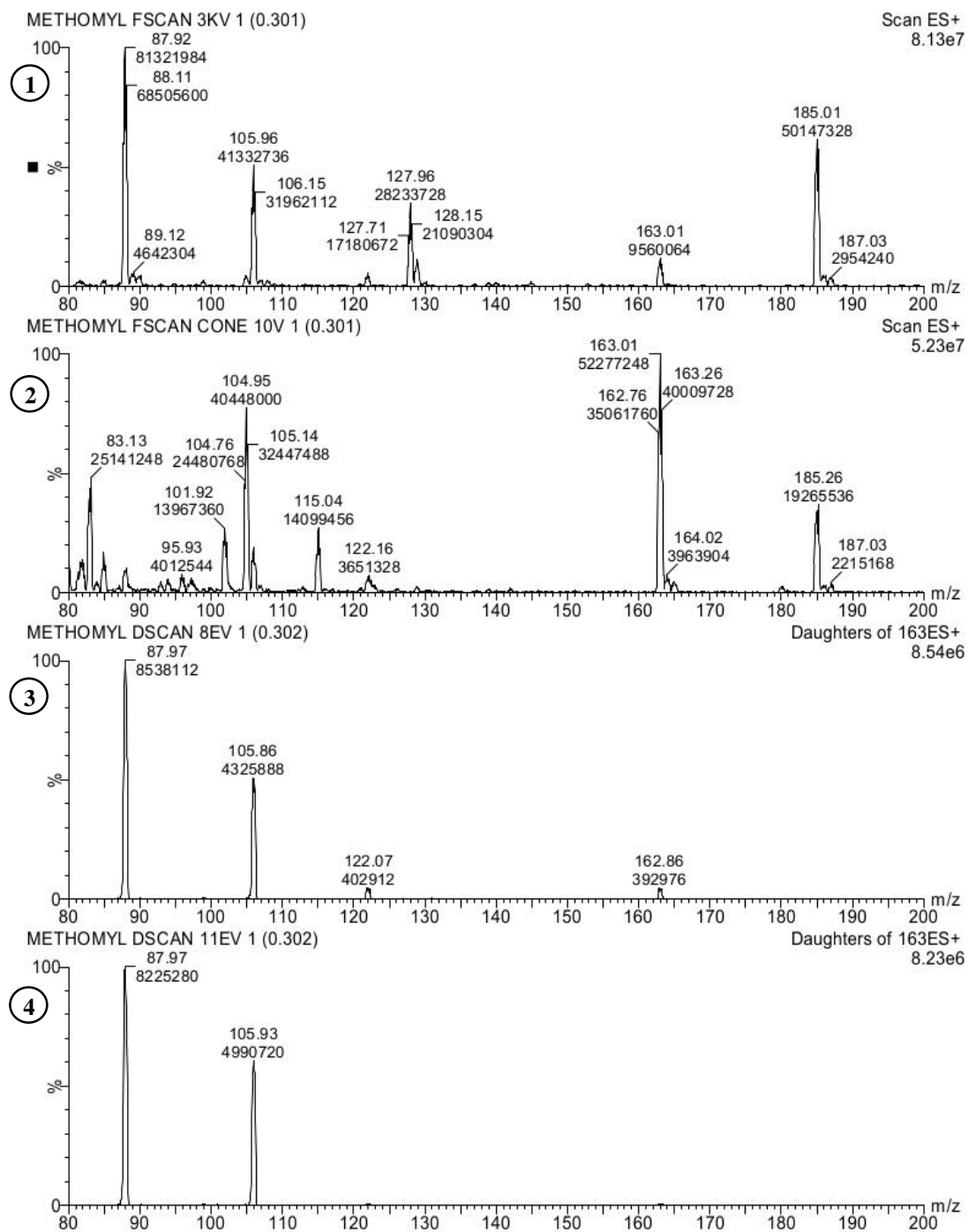
Metomil

Figura III.2: Espectros de massa do pesticida *metomil*. 1) Espectro de massa em modo full scan obtido durante a otimização da tensão capilar; 2) Espectro de massa em modo de full scan obtido durante a otimização da voltagem de cone; 3 e 4) espectros de massa em modo Daughter Scan para a transição de quantificação (MRM1) e confirmação (MRM2) respectivamente.

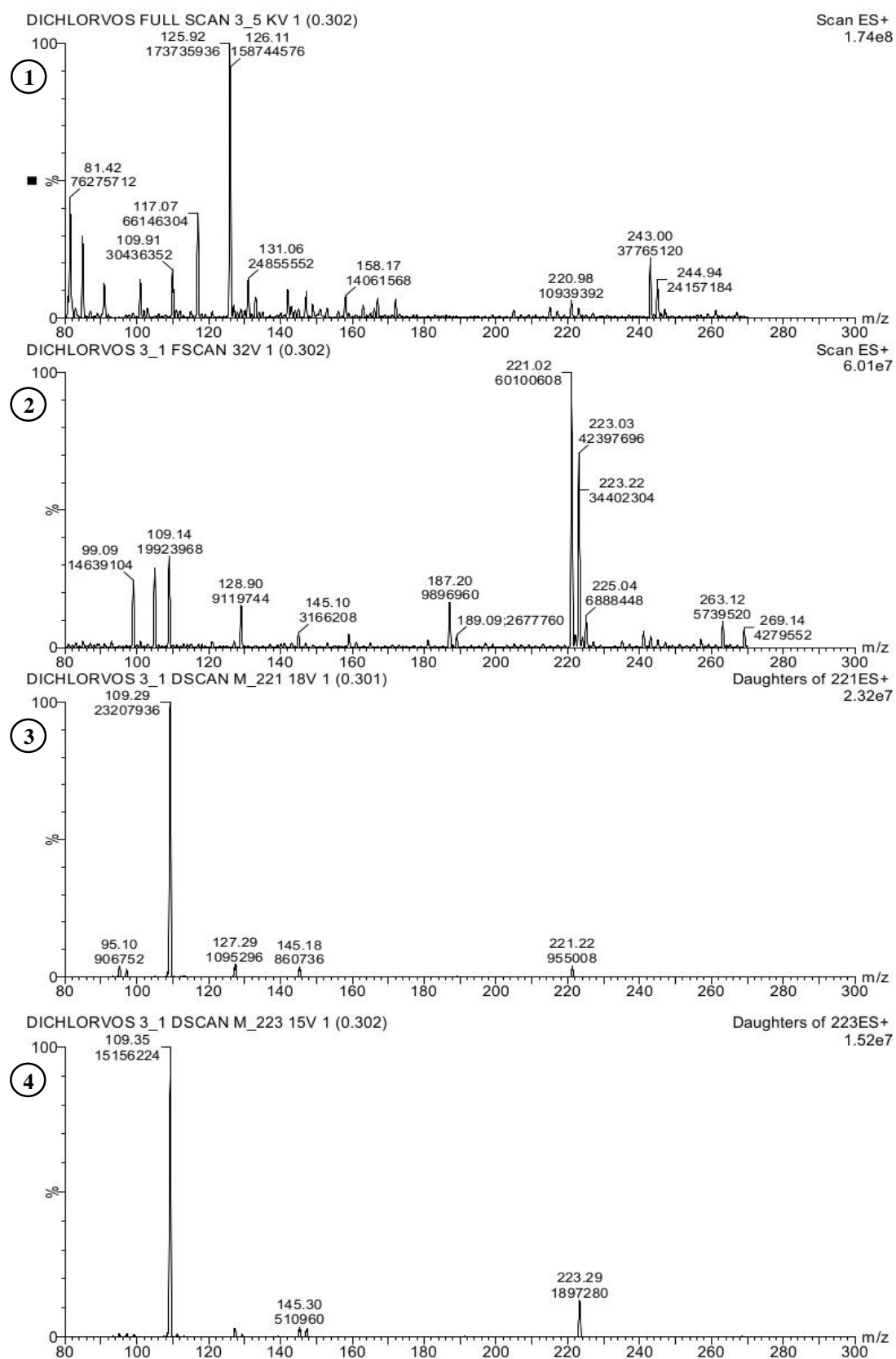
Diclorvos

Figura III.3: Espectros de massa do pesticida diclorvos. 1) Espectro de massa em modo full scan obtido durante a otimização da tensão capilar; 2) Espectro de massa em modo de full scan obtido durante a otimização da voltagem de cone; 3 e 4) espectros de massa em modo Daughter Scan para a transição de quantificação (MRM1) e confirmação (MRM2) respectivamente.

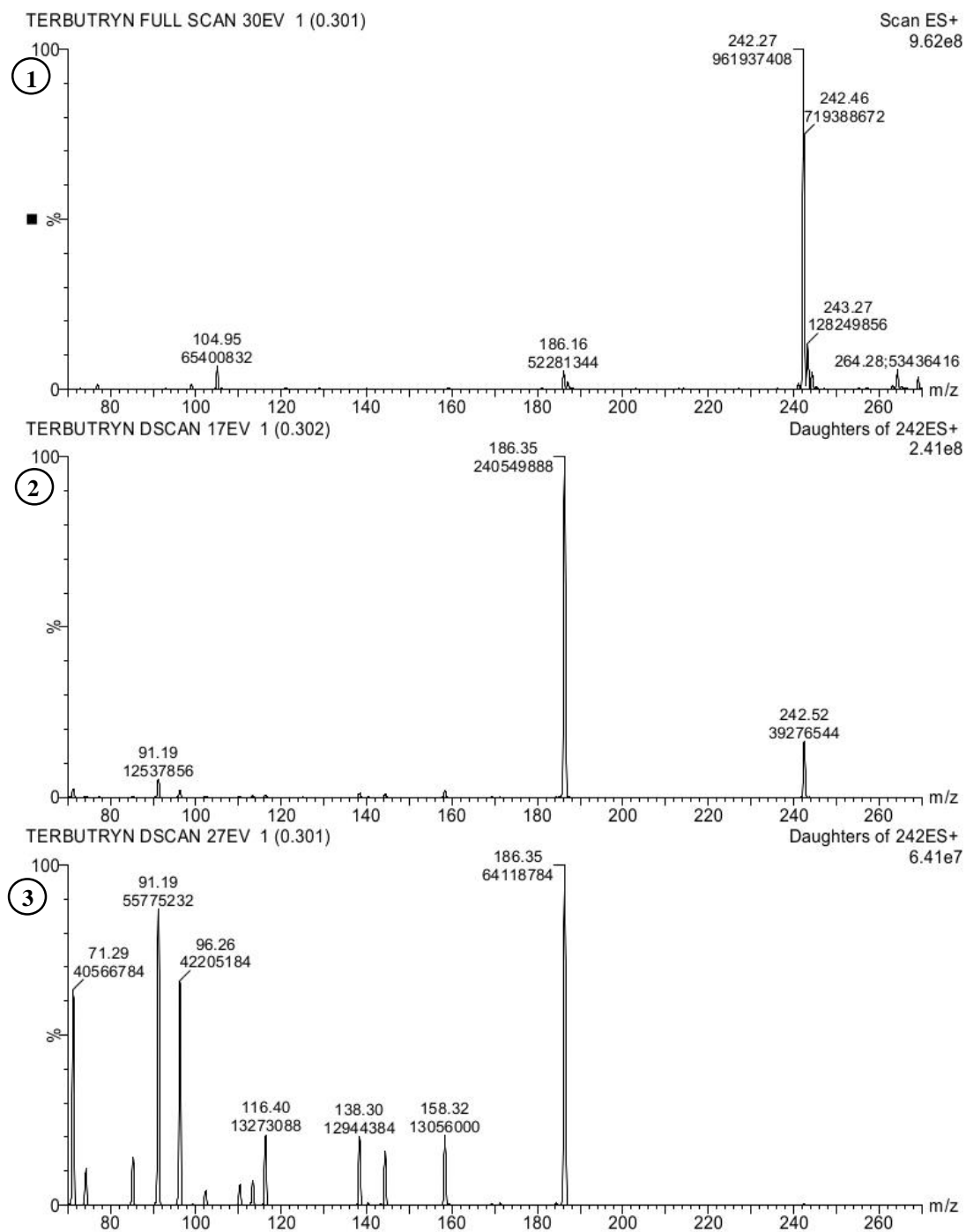
Terbutrina

Figura III.4: Espectros de massa do pesticida *terbutrina*. 1) Espectro de massa em modo de full scan obtido durante a otimização da voltagem de cone; 2 e 3) espectros de massa em modo Daughter Scan para a transição de quantificação (MRM1) e confirmação (MRM2) respectivamente.

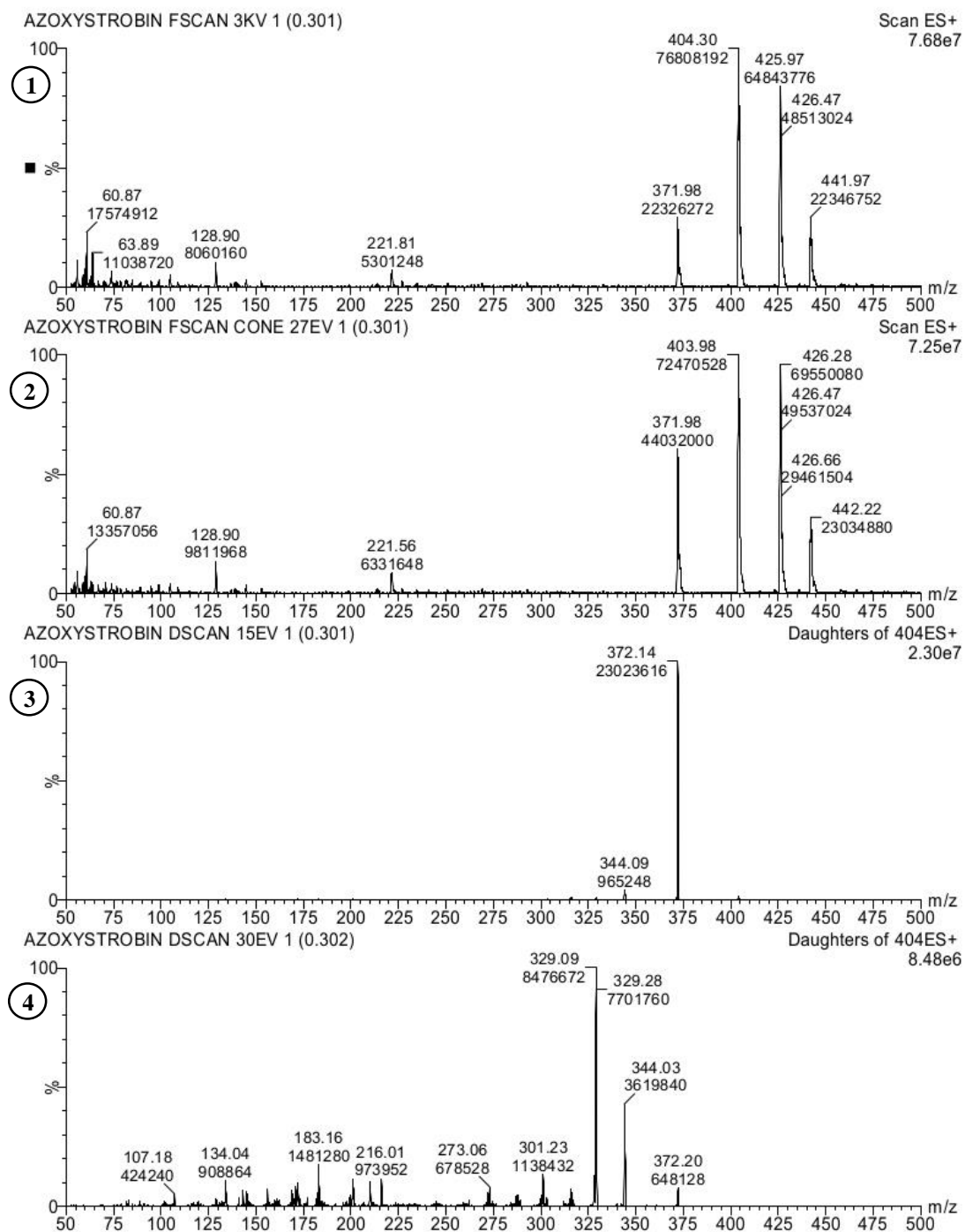
Azoxistrobina

Figura III.5: Espectros de massa do pesticida azoxistrobina. 1) Espectro de massa em modo full scan obtido durante a otimização da tensão capilar; 2) Espectro de massa em modo de full scan obtido durante a otimização da voltagem de cone; 3 e 4) espectros de massa em modo Daughter Scan para a transição de quantificação (MRM1) e confirmação (MRM2) respectivamente.

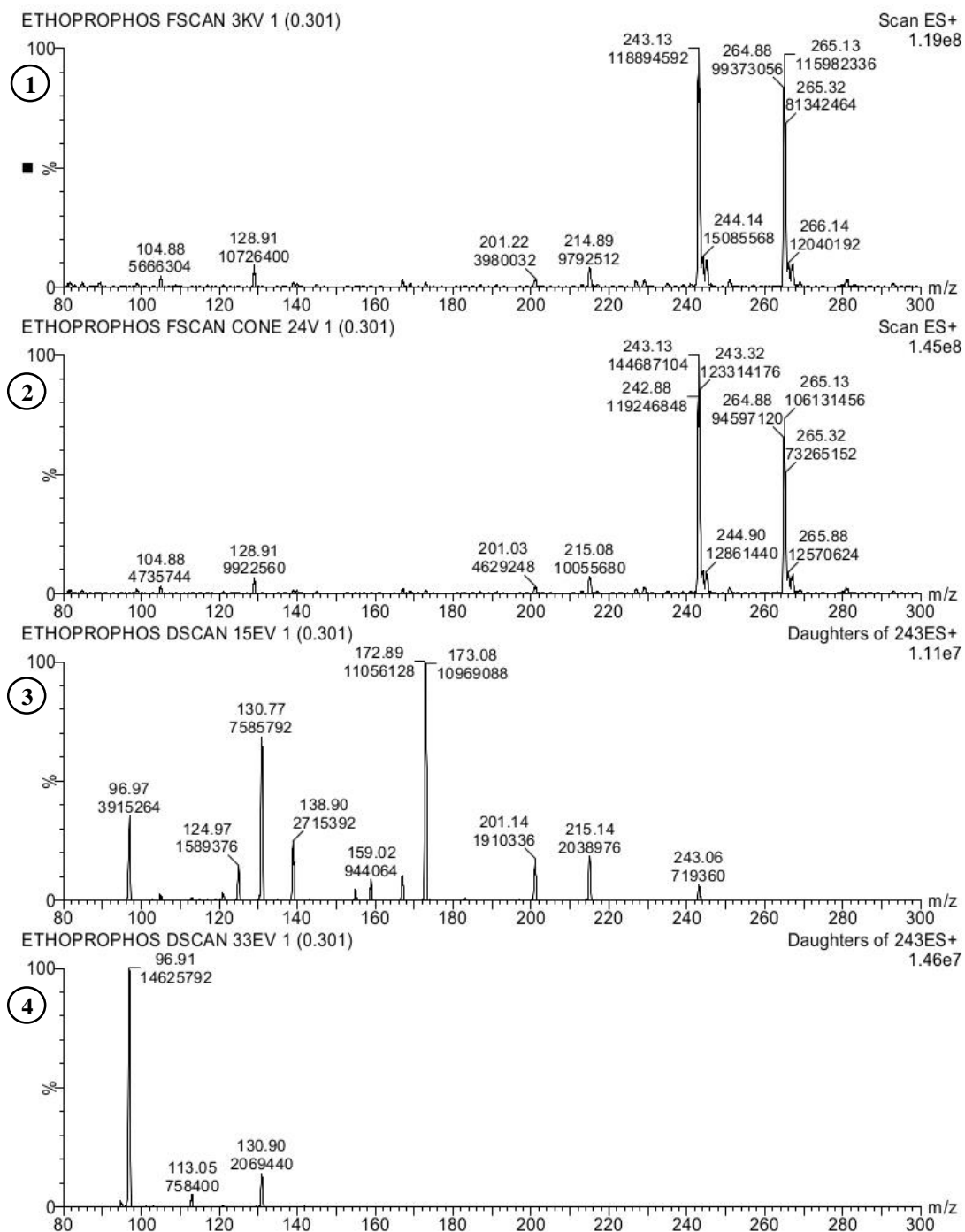
Etoprofos

Figura III.6: Espectros de massa do pesticida *etoprofos*. 1) Espectro de massa em modo full scan obtido durante a otimização da tensão capilar; 2) Espectro de massa em modo de full scan obtido durante a otimização da voltagem de cone; 3 e 4) espectros de massa em modo Daughter Scan para a transição de quantificação (MRM1) e confirmação (MRM2) respectivamente.

Anexo IV Desvio padrão e coeficiente de variação^[27]

O desvio padrão e o coeficiente de variação relativo são uma forma de avaliar a qualidade dos dados obtidos durante o trabalho experimental, dando uma ideia da dispersão de resultados. O desvio padrão pode ser calculado através da raiz quadrática positiva da variância, podendo a variância ser calculada de uma forma geral com recurso à equação seguinte:

$$S_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^i (y_{i,j} - \bar{y}_i)^2}{n-1} \quad \text{Equação IV.1}$$

Onde S_i^2 é a variância e $\bar{y}_i = \frac{\sum_{j=1}^i y_{i,j}}{n}$.

Sendo i o número de padrões e j o número de repetições.

O coeficiente de variação pode ser calculado de acordo com a expressão seguinte:

$$CV (\%) = \frac{S_i}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Equação IV.2}$$

Onde:

$CV (\%)$ – Coeficiente de variação em percentagem

S_i – Desvio Padrão

\bar{x} – Média dos valores de x

O coeficiente de variação é utilizado de diversas formas durante o processo de validação de um método, sendo utilizado para validar a estabilidade da razão de confirmação ao longo da gama de concentrações nas técnicas que recorrem ao método de MRM do espectrómetro de massa, assim como na verificação da existência de repetibilidade tanto a nível de injeções repetidas de padrões nas mesmas condições, e também na análise de diversas amostras fortificadas em sessões individuais para o cálculo da exatidão geral do método.

O valor máximo que se aceita para o coeficiente de variação é de 15 % para os ensaios de repetibilidade sejam estes feitos com padrões de calibração ou em amostras fortificadas. No método de UPLC-MS/MS calculou-se este coeficiente de variação para

Anexos

a análise de dados obtidos com as transições MRM1, MRM2 e para a razão de confirmação (MRM1/MRM2).

Nas tabelas seguintes apresenta-se a aplicação do cálculo do coeficiente de variação para a verificação da repetibilidade para o pesticida ometoato, bem como o resumo dos cálculos para os restantes pesticidas.

Estudos de precisão (UPLC-MS/MS)

Ometoato

Concentração: 0,015 µg/l

Concentração: 0,029 µg/l

	MRM1	MRM2	MRM1/MRM2	MRM1	MRM2	MRM1/MRM2
	147,9	83,7	1,77	276,3	168,6	1,64
	144,5	81,4	1,78	262,4	159,0	1,65
	131,5	83,4	1,58	268,2	171,7	1,56
	144,1	85,9	1,68	283,9	158,7	1,79
	127,3	70,7	1,80	277,7	148,4	1,87
	155,0	79,8	1,94	291,4	160,1	1,82
	125,0	87,2	1,43	278,4	152,6	1,82
	145,7	72,7	2,00	266,9	162,6	1,64
	148,6	65,2	2,28	280,5	158,3	1,77
	153,6	71,8	2,14	289,8	162,7	1,78
	141,5	81,9	1,73	291,6	154,6	1,89
	134,2	84,0	1,60	279,2	170,0	1,64
Média =	141,6	79,0	1,81	278,9	160,6	1,74
Desvio Padrão =	9,9	7,1	0,24	9,5	7,0	0,11
CV (%) =	7,00	8,93	13,5	3,42	4,38	6,16

Concentração: 0,044 µg/l

Concentração: 0,10 µg/l

	MRM1	MRM2	MRM1/MRM2	MRM1	MRM2	MRM1/MRM2
	407,9	242,0	1,69	910,5	527,8	1,73
	387,7	227,4	1,70	969,9	583,0	1,66
	425,6	251,4	1,69	947,1	569,8	1,66
	422,8	247,0	1,71	969,6	564,8	1,72
	411,4	255,0	1,61	945,7	586,3	1,61
	422,2	238,4	1,77	967,6	554,8	1,74
	386,2	236,4	1,63	928,8	570,5	1,63
	429,9	256,6	1,68	971,8	559,1	1,74
	424,4	236,8	1,79	926,4	532,3	1,74
	404,6	260,8	1,55	924,5	556,7	1,66
	423,4	250,3	1,69	942,6	557,7	1,69
	411,6	228,1	1,80	936,6	536,3	1,75
Média =	413,1	244,2	1,69	945,1	558,3	1,69
Desvio Padrão =	14,5	11,0	0,07	20,8	18,6	0,05
CV (%) =	3,52	4,52	4,33	2,20	3,34	2,80

Estudos de precisão (UPLC-MS/MS)

Metomil

Concentração: 0,016 µg/l

Concentração: 0,032 µg/l

	MRM1	MRM2	MRM1/MRM2	MRM1	MRM2	MRM1/MRM2
Média =	153,4	56,9	2,73	308,9	112,3	2,78
Desvio Padrão =	14,3	7,2	0,38	14,8	11,3	0,30
CV (%) =	9,31	12,69	13,87	4,79	10,07	10,96

Concentração: 0,048 µg/l

Concentração: 0,11 µg/l

	MRM1	MRM2	MRM1/MRM2	MRM1	MRM2	MRM1/MRM2
Média =	474,3	163,6	2,91	1067,8	392,5	2,73
Desvio Padrão =	21,2	11,9	0,27	32,6	24,3	0,20
CV (%) =	4,47	7,26	9,40	3,05	6,19	7,40

Diclorvos

Concentração: 0,016 µg/l

Concentração: 0,031 µg/l

	MRM1	MRM2	MRM1/MRM2	MRM1	MRM2	MRM1/MRM2
Média =	267,6	168,9	1,60	516,0	320,3	1,63
Desvio Padrão =	21,3	17,7	0,22	37,1	32,6	0,24
CV (%) =	7,96	10,49	13,78	7,19	10,18	14,43

Concentração: 0,047 µg/l

Concentração: 0,11 µg/l

	MRM1	MRM2	MRM1/MRM2	MRM1	MRM2	MRM1/MRM2
Média =	737,0	484,2	1,53	1699,3	1054,4	1,62
Desvio Padrão =	49,0	25,6	0,12	63,1	49,0	0,11
CV (%) =	6,65	5,28	7,56	3,71	4,65	6,63

Estudos de precisão (UPLC-MS/MS)

Tiodicarbe

Concentração: 0,016 µg/l

Concentração: 0,031 µg/l

	MRM1	MRM2	MRM1/MRM2	MRM1	MRM2	MRM1/MRM2
Média =	131,8	37,0	3,62	258,8	62,4	4,25
Desvio Padrão =	12,4	5,3	0,52	29,7	10,3	0,86
CV (%) =	9,44	14,3	14,5	11,5	16,5	20,2

Concentração: 0,047 µg/l

Concentração: 0,11 µg/l

	MRM1	MRM2	MRM1/MRM2	MRM1	MRM2	MRM1/MRM2
Média =	423,3	106,3	4,00	1011,8	248,4	4,10
Desvio Padrão =	29,5	8,6	0,34	54,7	19,8	0,42
CV (%) =	6,97	8,05	8,48	5,41	7,97	10,3

Terbutrina

Concentração: 0,018 µg/l

Concentração: 0,036 µg/l

	MRM1	MRM2	MRM1/MRM2	MRM1	MRM2	MRM1/MRM2
Média =	897,8	195,6	4,63	1745,0	395,9	4,41
Desvio Padrão =	39,5	20,6	0,49	94,6	16,4	0,28
CV (%) =	4,40	10,6	10,6	5,42	4,14	6,38

Concentração: 0,054 µg/l

Concentração: 0,13 µg/l

	MRM1	MRM2	MRM1/MRM2	MRM1	MRM2	MRM1/MRM2
Média =	2638,4	614,0	4,31	6340,7	1430,3	4,44
Desvio Padrão =	96,2	32,5	0,21	138,9	50,2	0,23
CV (%) =	3,65	5,29	4,88	2,19	3,51	5,12

Estudos de precisão (UPLC-MS/MS)

Azoxistrobina

Concentração: 0,016 µg/l

Concentração: 0,095 µg/l

	MRM1	MRM2	MRM1/MRM2	MRM1	MRM2	MRM1/MRM2
Média =	247,2	74,8	3,37	1682,6	517,9	3,26
Desvio Padrão =	23,0	11,6	0,57	70,3	24,5	0,22
CV (%) =	9,28	15,5	16,9	4,18	4,73	6,72

Concentração: 0,011 µg/l

	MRM1	MRM2	MRM1/MRM2
Média =	2026,1	640,7	3,17
Desvio Padrão =	68,3	43,4	0,22
CV (%) =	3,37	6,77	6,94

Etoprofos

Concentração: 0,014 µg/l

Concentração: 0,028 µg/l

	MRM1	MRM2	MRM1/MRM2	MRM1	MRM2	MRM1/MRM2
Média =	249,5	265,0	0,95	498,3	496,7	1,00
Desvio Padrão =	9,9	24,1	0,09	19,6	26,2	0,05
CV (%) =	3,96	9,10	9,42	3,92	5,28	4,95

Concentração: 0,041 µg/l

Concentração: 0,096 µg/l

	MRM1	MRM2	MRM1/MRM2	MRM1	MRM2	MRM1/MRM2
Média =	742,1	741,9	1,00	1721,2	1738,9	0,99
Desvio Padrão =	27,8	22,4	0,05	28,5	37,4	0,02
CV (%) =	3,74	3,01	5,36	1,65	2,15	2,34

Estudos de precisão (UPLC-MS/MS)

Bifenox

	Concentração: 12 µg/l			Concentração: 28 µg/l		
	MRM1	MRM2	MRM1/MRM2	MRM1	MRM2	MRM1/MRM2
Média =	430,3	129,7	3,44	994,2	297,2	3,38
Desvio Padrão =	26,6	27,1	0,67	51,3	35,0	0,40
CV (%) =	6,19	20,9	19,4	5,16	11,8	11,8

	Concentração: 80 µg/l			Concentração: 100 µg/l		
	MRM1	MRM2	MRM1/MRM2	MRM1	MRM2	MRM1/MRM2
Média =	2735,2	794,1	3,46	3524,3	1017,6	3,47
Desvio Padrão =	101,3	46,7	0,24	144,0	59,4	0,20
CV (%) =	3,71	5,88	6,92	4,09	5,84	5,82

Estudos de precisão (GC-µECD)

Dicofol

	Concentração (µg/l)			
	5,1	13	46	51
Média =	432,5	1053,9	3280,8	3649,5
Desvio Padrão =	12,8	15,8	50,8	34,6
CV (%) =	2,96	1,50	1,55	0,95

Aclonifena

	Concentração (µg/l)			
	5,0	13	45	50
Média =	782,9	1899,0	6135,3	7020,7
Desvio Padrão =	22,3	38,9	119,7	123,5
CV (%) =	2,85	2,05	1,95	1,76

Estudos de precisão (GC- μ ECD)Quinoxifena

	Concentração ($\mu\text{g/l}$)			
	5,0	13	45	50
Média =	511,0	1136,1	3395,3	3839,9
Desvio Padrão =	25,5	33,5	65,7	49,1
CV (%) =	4,98	2,95	1,93	1,28

Iprodiona

	Concentração ($\mu\text{g/l}$)			
	20	50	181	201
Média =	1193,0	2623,9	9972,8	11780,4
Desvio Padrão =	23,5	60,0	681,9	269,7
CV (%) =	1,97	2,29	6,84	2,29

Cipermetrina totalConcentração: 50 $\mu\text{g/l}$ Concentração: 181 $\mu\text{g/l}$

	Concentração: 50 $\mu\text{g/l}$					Concentração: 181 $\mu\text{g/l}$				
	Área Pico A	Área Pico B	Área Pico C	Área Pico D	Área Total	Área Pico A	Área Pico B	Área Pico C	Área Pico D	Área Total
Média =	425,2	311,2	592,0	375,8	1704,2	1844,3	1380,8	2655,3	1696,7	7577,0
Desvio Padrão =	9,1	11,4	21,6	21,7	53,2	96,3	72,3	123,9	130,1	402,4
CV (%) =	2,15	3,65	3,65	5,76	3,12	5,22	5,23	4,67	7,67	5,31

DeltametrinaConcentração: 63 $\mu\text{g/l}$ Concentração: 226 $\mu\text{g/l}$

	Concentração: 63 $\mu\text{g/l}$			Concentração: 226 $\mu\text{g/l}$		
	Área Pico A	Área Pico B	Área Total	Área Pico A	Área Pico B	Área Total
Média =	423,1	581,6	1004,7	2072,8	3158,0	5230,8
Desvio Padrão =	18,0	36,0	51,2	160,1	281,2	439,8
CV (%) =	4,25	6,19	5,10	7,72	8,90	8,41

Anexo V Método dos mínimos quadrados^[27]

Qualquer equação linear pode ser descrita pela Equação V.1, sendo esta formada por pares ordenados e independentes de pontos $(x_1, y_1; \dots; x_n, y_n)$, onde n é o número de pontos da curva, e para o presente caso, x corresponde à concentração do analito e y a resposta do equipamento convertida em áreas.

$$y = a + bx \quad \text{Equação V.1}$$

b – Declive

a – Ordenada na origem

Anexo V.1 Regressão linear

A curva obtida através da regressão linear é a curva que se aproxima mais de todos os pontos experimentais, sendo esta a representação estatisticamente mais próxima dos valores reais. A regressão linear pode ser calculada através das seguintes equações:

$$b = \frac{\sum_{i=1}^N ((x_i - \bar{x}) \times (y_i - \bar{y}))}{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \quad \text{Equação V.2}$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad \text{Equação V.3}$$

Para o cálculo da concentração de uma solução utiliza-se a equação obtida na regressão linear, sendo que quando se executam repetições de uma mesma análise se utiliza o valor médio das respostas do equipamento para o cálculo da concentração média.

$$x = \frac{(y - a)}{b} \quad \text{Equação V.4}$$

Anexo V.2 Coeficiente de correlação linear

A determinação deste parâmetro é o primeiro teste estatístico que se utiliza para verificar a linearidade da curva de calibração. Este coeficiente de correlação pode ser calculado com recurso à expressão:

$$\rho = \frac{\sum_{i=1}^N ((x_i - \bar{x}) \times (y_i - \bar{y}))}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2 \times \sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2}} \quad \text{Equação V.5}$$

Onde:

ρ – Coeficiente de correlação linear (também representado por r)

N – Número de pontos da curva

x_i – Concentração de cada ponto i

\bar{x} – Média das x_i concentrações

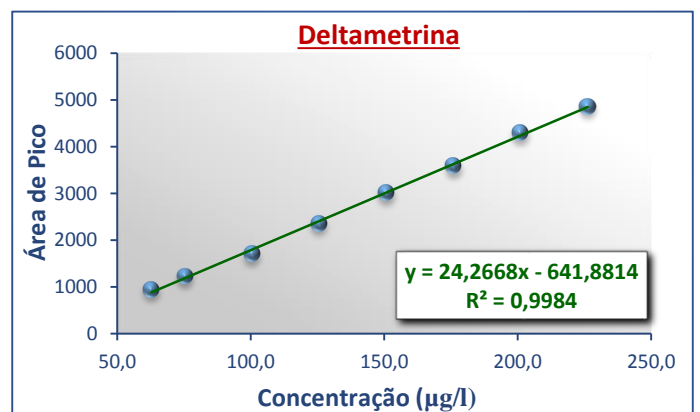
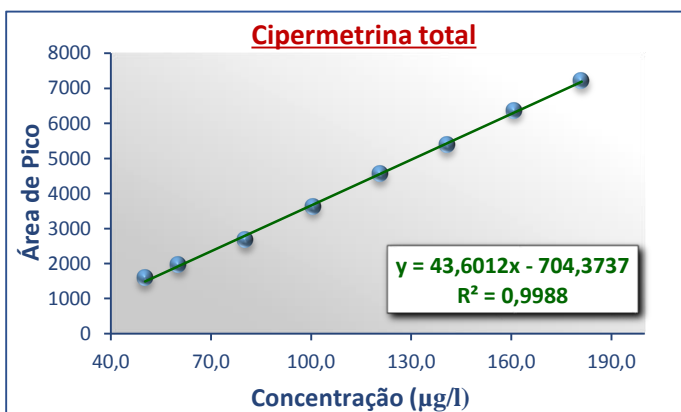
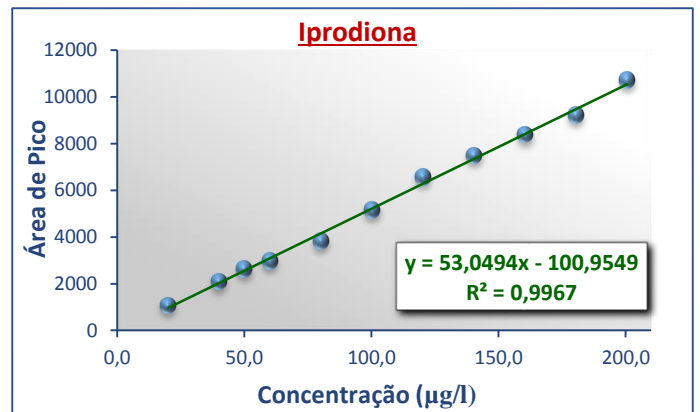
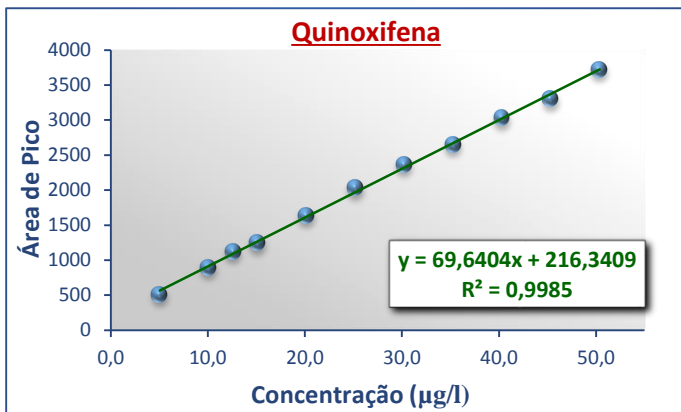
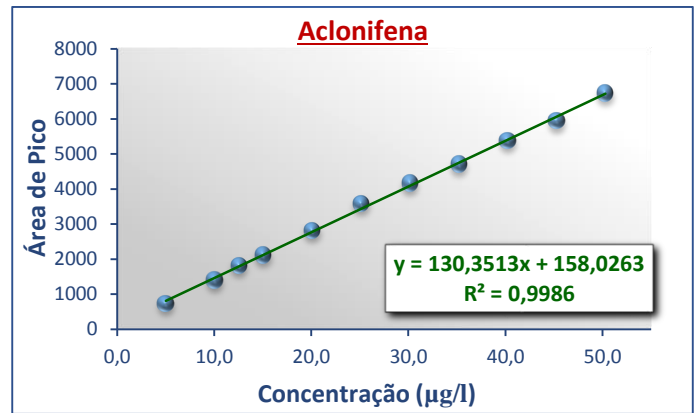
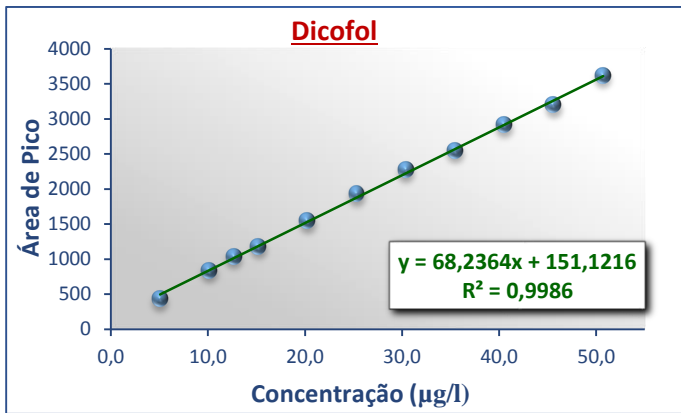
y_i – Resposta do equipamento para cada ponto i

\bar{y} – Média das respostas do equipamento y_i

Considera-se que a curva de calibração apresenta uma correlação aceitável quando o valor de quadrado do coeficiente de correlação for igual ou superior a 0,995. Este valor varia entre +1 (curvas crescentes) e -1 (curvas decrescentes), sendo que quanto mais próximo de |1| maior é o grau de correlação linear entre y e x.

Nos gráficos seguintes apresentam-se as representações das curvas de calibração validadas para o método de GC-ECD.

Curva de Calibração (GC- μ ECD)



Anexo VI Teste da Análise de Resíduos

Este teste serve para verificar se existe um grande afastamento de cada ponto experimental em relação à curva obtida pela regressão linear, uma vez que é possível obter um valor aceitável para o coeficiente de correlação quadrático, mesmo existindo grandes afastamentos à curva obtida pela regressão linear. Isto deve-se principalmente a que resultados de padrões de concentração elevada podem “mascarar” desvios grandes nos padrões de concentração muito baixa, fazendo com que se obtenha um coeficiente de correlação linear válido e ao mesmo tempo grandes desvios à curva da regressão linear para as concentrações mais baixas.

Este teste consiste em calcular as áreas teóricas de cada um dos padrões de calibração com recurso à equação linear da curva de calibração. Utilizando os valores das áreas experimentais dos padrões de calibração e os valores das áreas teóricas pode-se calcular o desvio relativo à curva da regressão linear da área experimental de cada padrão, utilizando-se como margem de aceitação, um desvio de $\pm 15\%$ do valor da curva da regressão linear.

$$\text{Resíduos (\%)} = \frac{A_{exp}}{A_{teorica}} \times 100 - 100 \quad \text{Equação VI.1}$$

Na página seguinte apresenta-se a aplicação do teste da análise de resíduos do pesticida ometoato para uma curva de calibração preparada em água:metanol (9:1), com 0,1 mM de acetato de amónio, e em água ultrapura para o método de UPLC-MS/MS, bem como as suas representações gráficas, seguido da representação gráfica do teste da análise de resíduos para os restantes pesticidas para o método de UPLC-MS/MS e GC-ECD.

Teste da análise de resíduos – (UPLC-MS/MS)

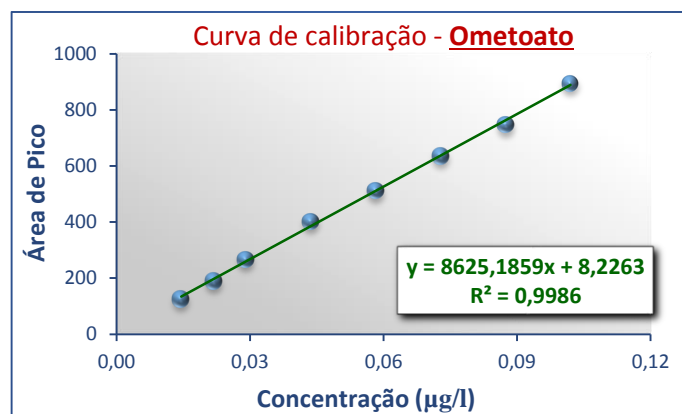
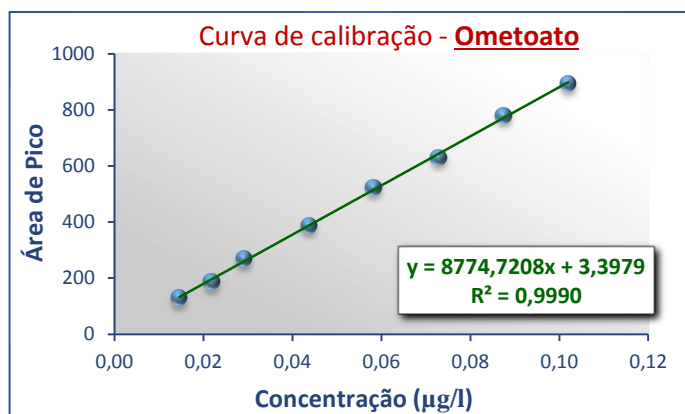
Ometoato

Solvente água:metanol (9:1), com 0,1 mM de acetato de amônio

Concentração (µg/l)	Área de Pico
0,015	129,1
0,022	186,5
0,029	268,5
0,044	388,1
0,058	524,4
0,073	631,0
0,087	780,8
0,102	893,5

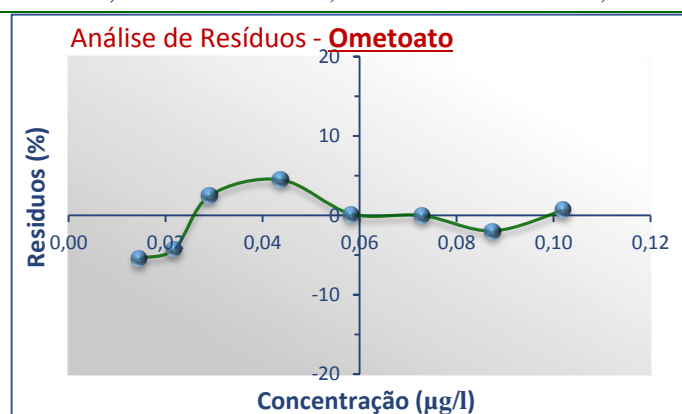
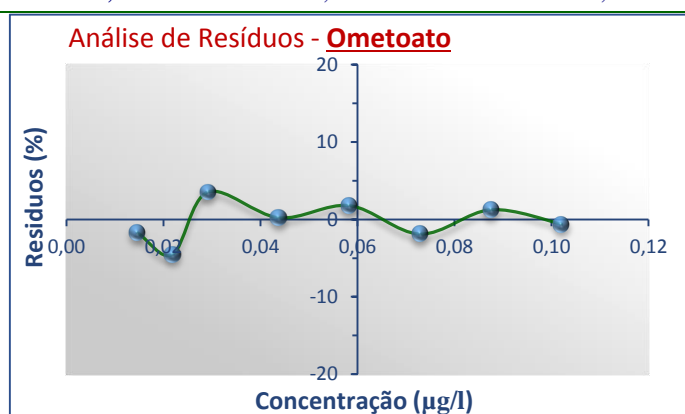
Solvente: água ultrapura

Concentração (µg/l)	Área de Pico
0,015	126,7
0,022	188,6
0,029	266,3
0,044	402,9
0,058	512,2
0,073	637,0
0,087	747,9
0,102	894,6



Área de Pico estimada	Área Experimental/Área Estimada	Desvios (%)
131,4	0,983	-1,7
195,3	0,955	-4,5
259,3	1,035	3,5
387,3	1,002	0,2
515,2	1,018	1,8
643,2	0,981	-1,9
771,1	1,013	1,3
899,1	0,994	-0,6

Área de Pico estimada	Área Experimental/Área Estimada	Desvios (%)
134,0	0,946	-5,4
196,9	0,958	-4,2
259,8	1,025	2,5
385,6	1,045	4,5
511,3	1,002	0,2
637,1	1,000	0,0
762,9	0,980	-2,0
888,7	1,007	0,7

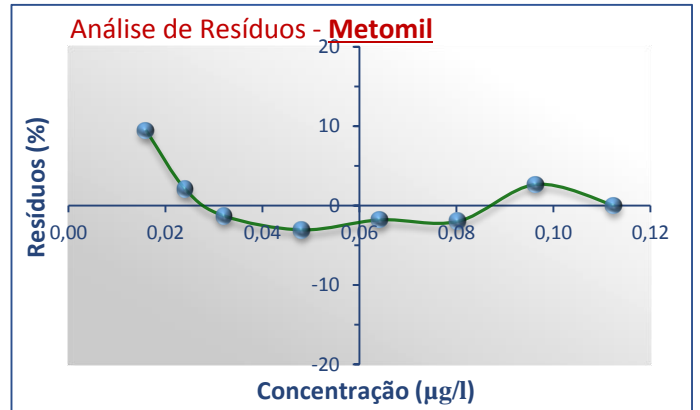
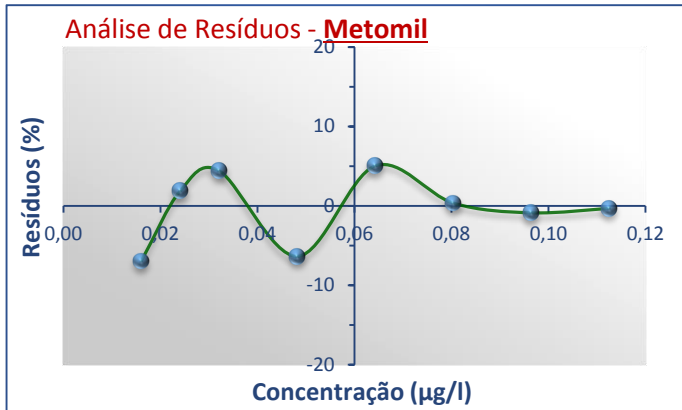


Teste da análise de resíduos – (UPLC-MS/MS)

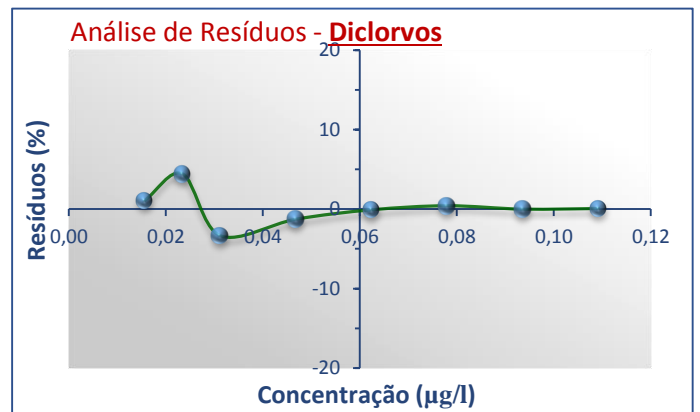
Solvente água:metanol (9:1), com 0,1 mM de acetato de amônio

Solvente: água ultrapura

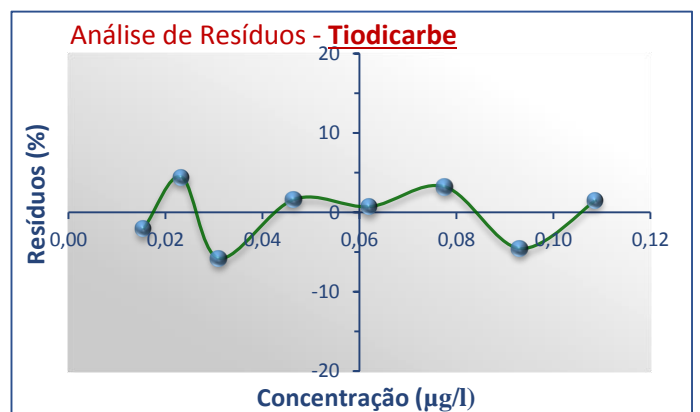
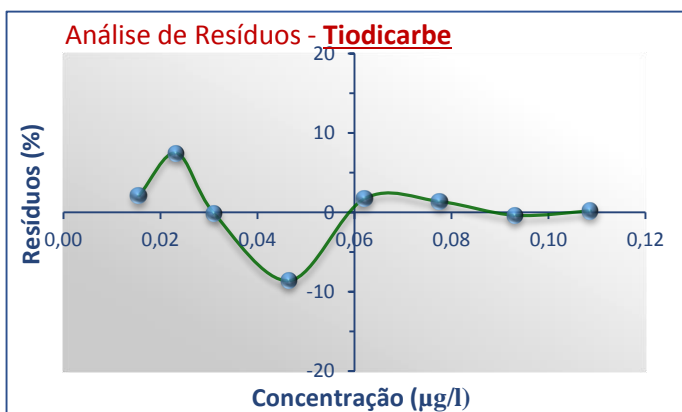
Metomil



Diclorvos



Tiodicarbe

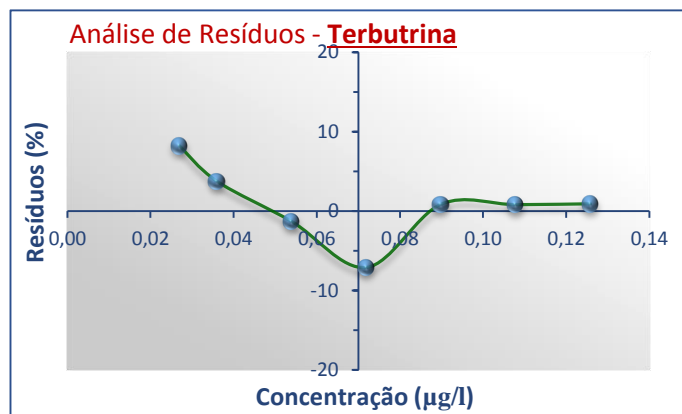
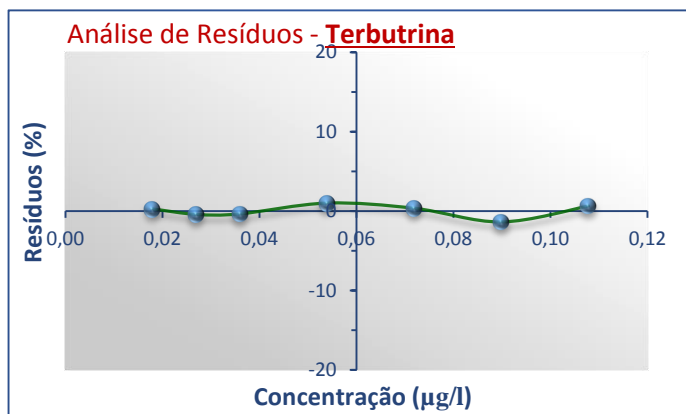


Teste da análise de resíduos – (UPLC-MS/MS)

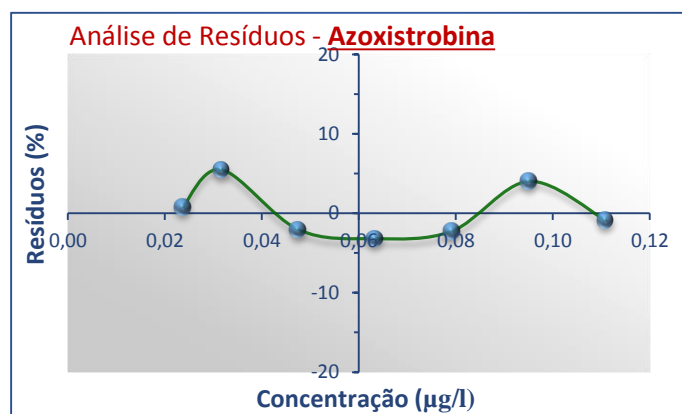
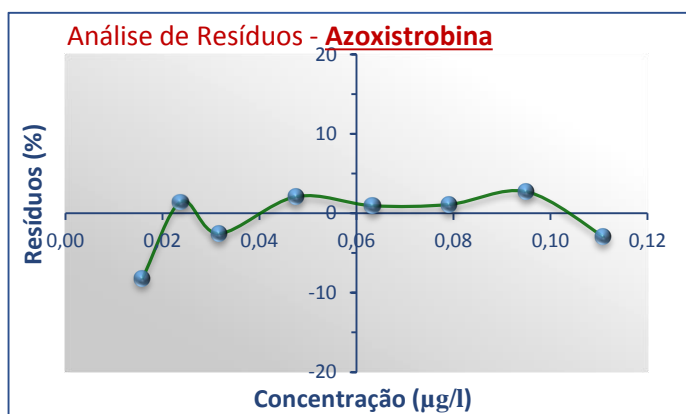
Solvente água:metanol (9:1), com 0,1 mM de acetato de amônio

Solvente: água ultrapura

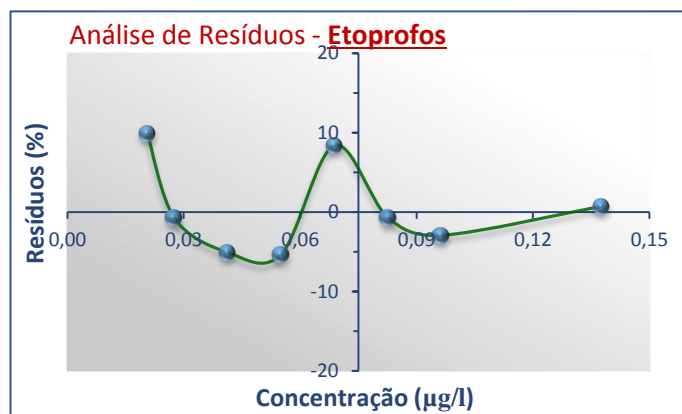
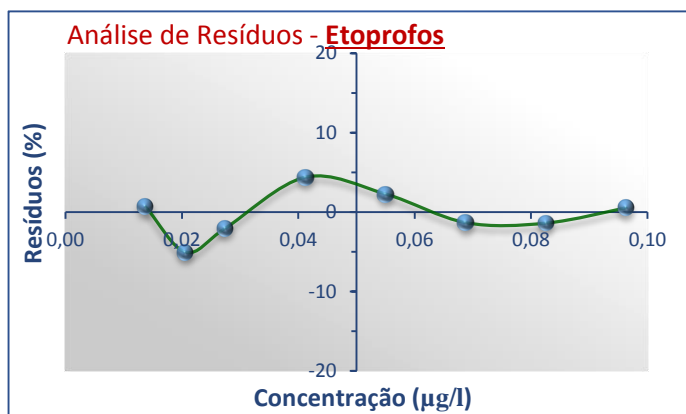
Terbutrina



Azoxistrobina



Etoprofos

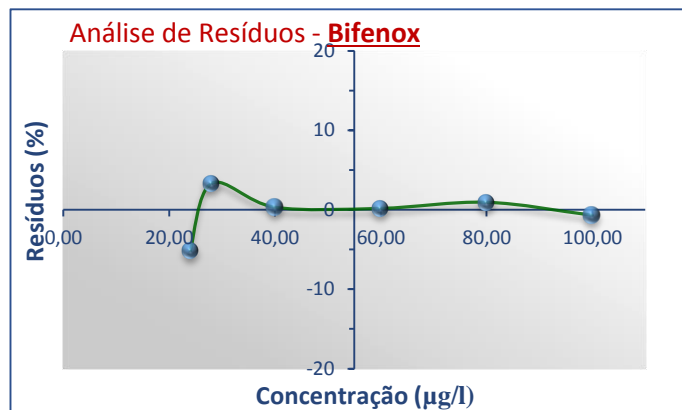
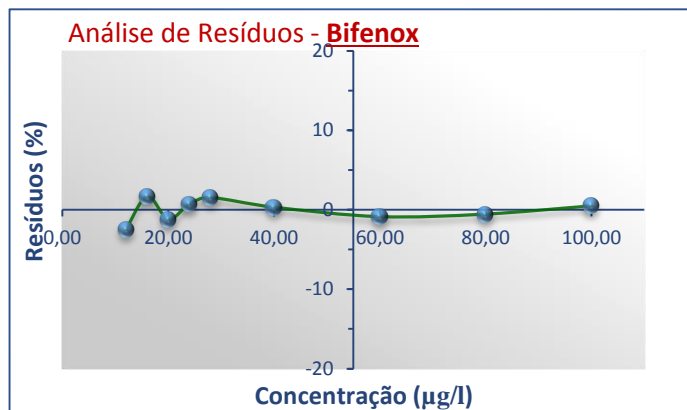


Teste da análise de resíduos – (UPLC-MS/MS)

Solvente água:metanol (9:1), com 0,1 mM de acetato de amônio

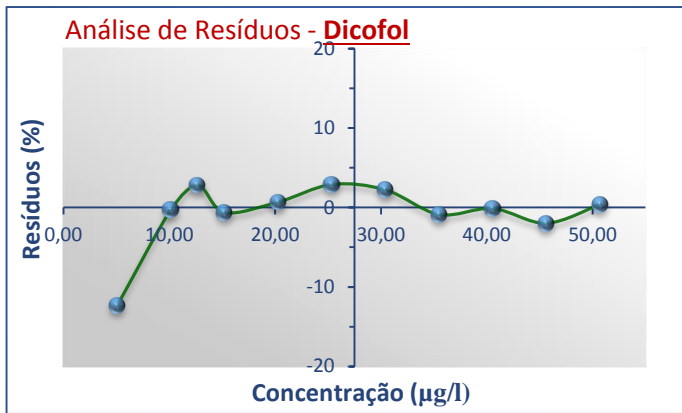
Solvente: água ultrapura

Bifenox

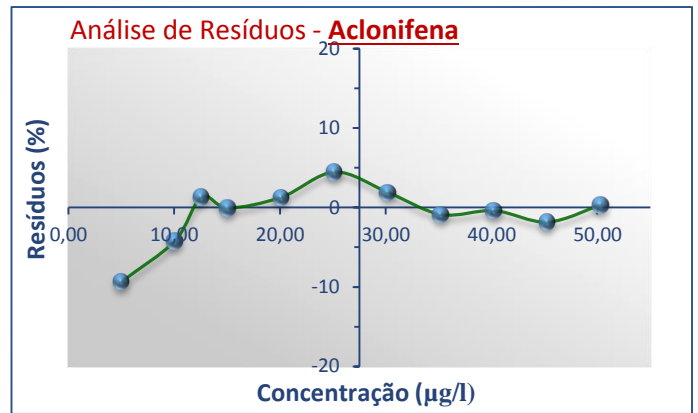


Teste da análise de resíduos – (GC- μ ECD)

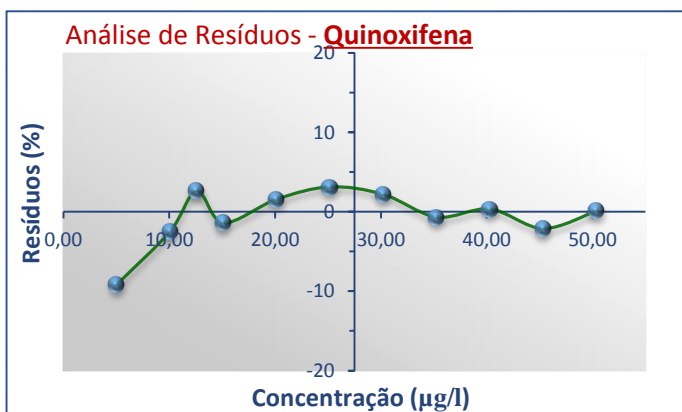
Dicofol



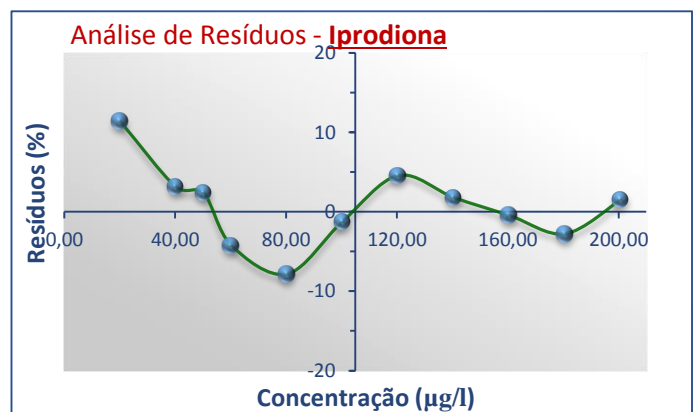
Aclonifena



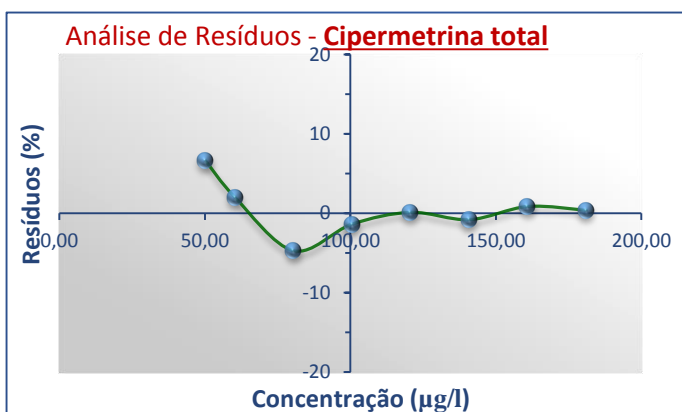
Quinoxifena



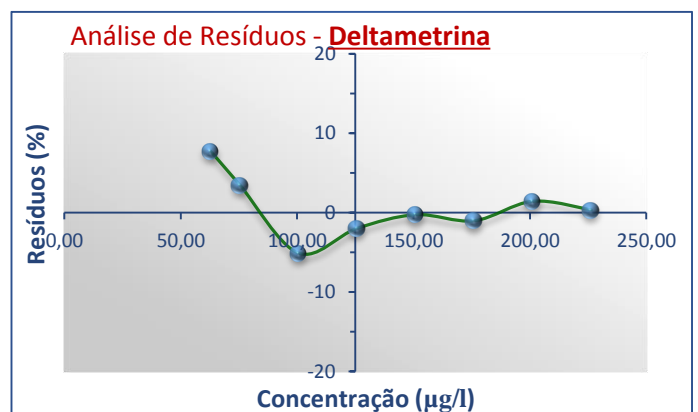
Iprodiona



Cipermetrina total



Deltametrina



Anexo VII Estabilidade da razão de confirmação

Para a aplicação do método de MRM num espectrómetro de massa é necessário que se consigam identificar 2 transições características do composto a analisar. A forma de qualificar duas transições como características do composto é através da razão entre estas, sendo necessário que a razão entre as duas transições seja constante ao longo da gama de trabalho. Este fator é a razão MRM1/MRM2 ou razão de confirmação, *RC*, sendo a média das *RC* ao longo da curva de calibração o fator de identificação da presença do pesticida.

Para avaliar a estabilidade das transições de um composto ao longo da gama de trabalho faz-se uma curva de calibração, e depois de se verificar a linearidade da mesma, calcula-se a razão de confirmação de acordo com a equação seguinte:

$$RC = \frac{A_i^{MRM1}}{A_i^{MRM2}} \quad \text{Equação VII.1}$$

RC – Razão de confirmação

A_i^{MRM1} – Área do pico da transição MRM1 para o padrão *i*

A_i^{MRM2} – Área do pico da transição MRM2 para o padrão *i*.

Com estes valores calcula-se a média, desvio padrão e coeficiente de variação, sendo que é necessário que este seja inferior a 15 % para se considerar que existe estabilidade de transições e de que estas podem ser utilizadas para o fim de confirmação do composto.

Na página seguinte apresenta-se o cálculo da razão de confirmação, razão de confirmação média, desvio padrão e coeficiente de variação ao longo da gama de linearidade para o pesticida ometoato para uma curva de calibração preparada em água:metanol (9:1), com 0,1 mM de acetato de amónio, e em água ultrapura, bem como as suas representações gráficas, seguido do resumo e representação gráfica para os restantes pesticidas.

Estabilidade da razão de confirmação

Ometoato

Solvente água:metanol (9:1), com 0,1 mM de acetato de amônio

Solvente: água ultrapura

Concentração (µg/l)	Área de Pico MRM1	Área de Pico MRM2	Razão de confirmação
0,015	129,1	79,8	1,618
0,022	186,5	117,1	1,593
0,029	268,5	147,9	1,815
0,044	388,1	237,6	1,633
0,058	524,4	318,1	1,649
0,073	631,0	382,9	1,648
0,087	780,8	490,8	1,591
0,102	893,5	584,6	1,528

Concentração (µg/l)	Área de pico MRM1	Área de Pico MRM2	Razão de confirmação
0,015	126,7	74,6	1,698
0,022	188,6	115,9	1,627
0,029	266,3	164,4	1,620
0,044	402,9	238,0	1,693
0,058	512,2	320,9	1,596
0,073	637,0	400,7	1,590
0,087	747,9	473,9	1,578
0,102	894,6	563,4	1,588

Média = 1,63

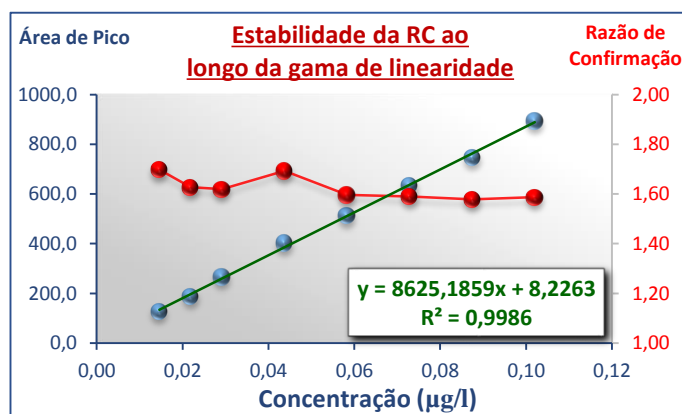
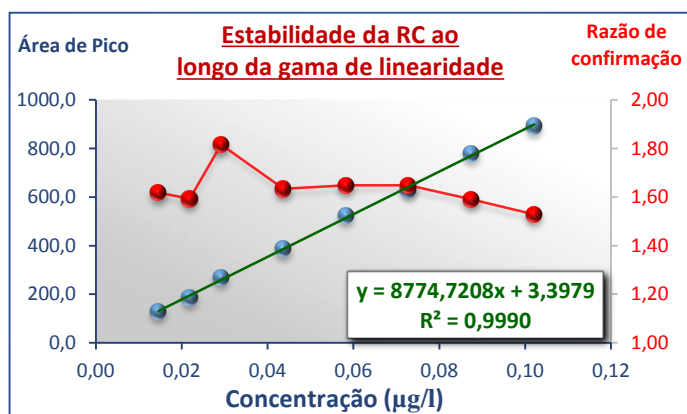
Desvio padrão = 0,083

Coefficiente de variação (%) = 5,08

Média = 1,62

Desvio Padrão = 0,047

Coefficiente de variação (%) = 2,91

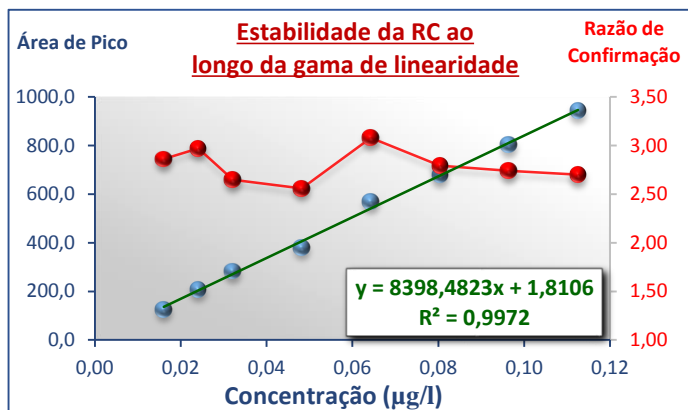


Estabilidade da razão de confirmação

Metomil

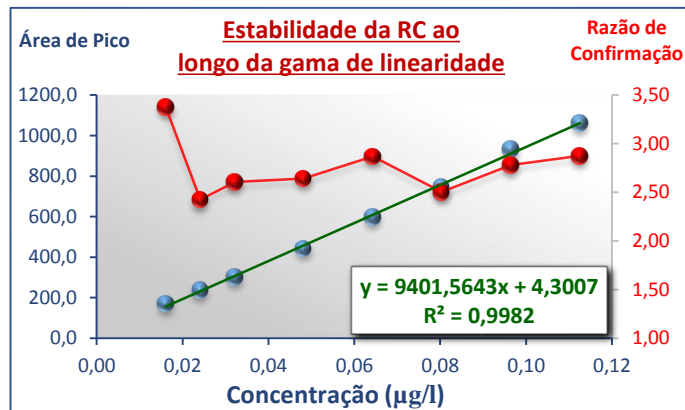
Solvente água:metanol (9:1), com 0,1 mM de acetato de amônio

Média = 2,79
Desvio padrão = 0,17
Coefficiente de variação (%) = 6,14



Solvente: água ultrapura

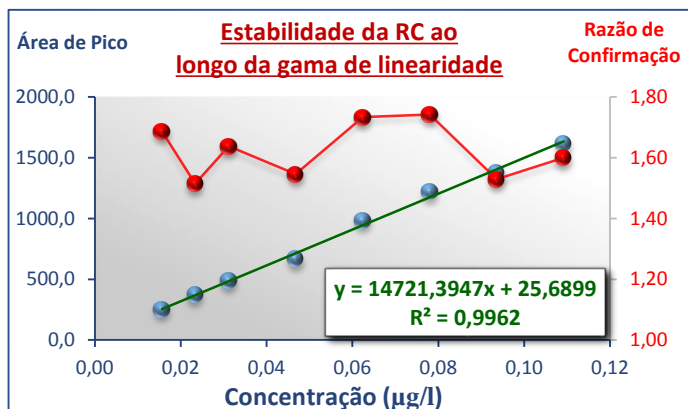
Média = 2,76
Desvio Padrão = 0,30
Coefficiente de variação (%) = 10,8



Diclorvos

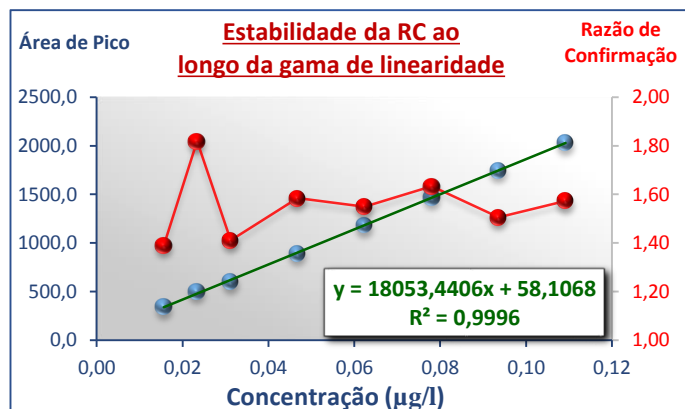
Solvente água:metanol (9:1), com 0,1 mM de acetato de amônio

Média = 1,62
Desvio padrão = 0,091
Coefficiente de variação (%) = 5,59



Solvente: água ultrapura

Média = 1,56
Desvio Padrão = 0,14
Coefficiente de variação (%) = 8,67

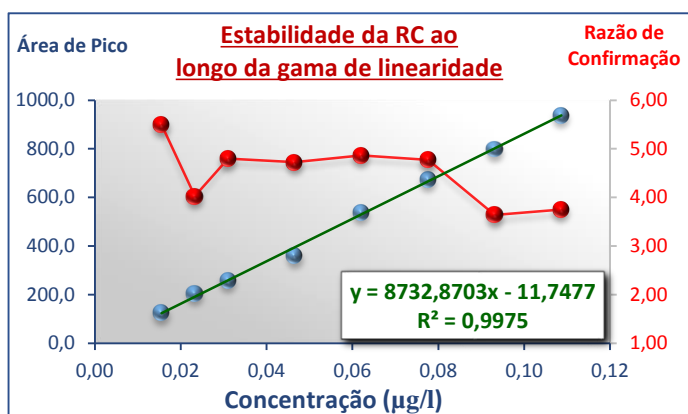


Estabilidade da razão de confirmação

Tiodicarbe

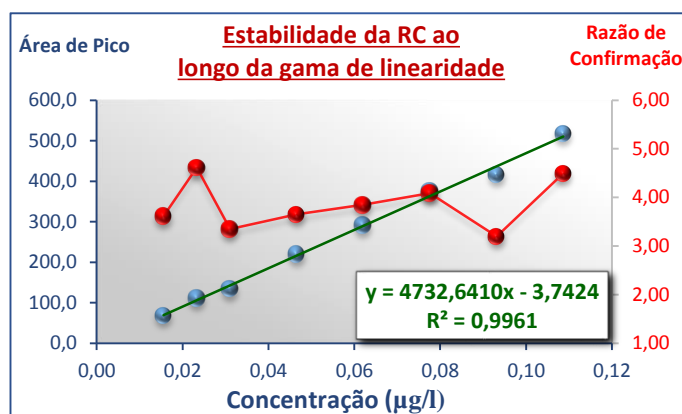
Solvente água:metanol (9:1), com 0,1 mM de acetato de amônio

Média = 4,51
 Desvio padrão = 0,64
 Coeficiente de variação (%) = 14,2



Solvente: água ultrapura

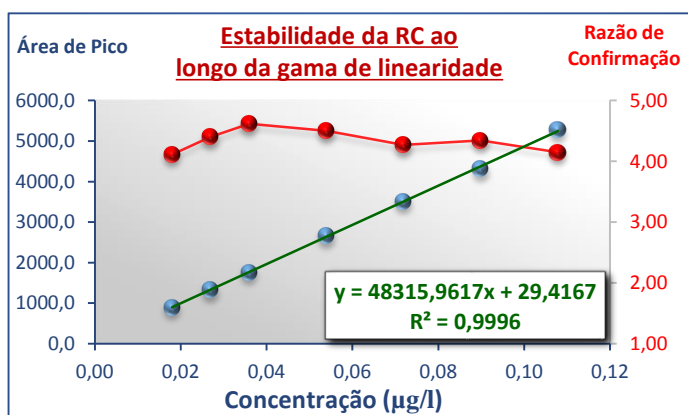
Média = 3,86
 Desvio Padrão = 0,51
 Coeficiente de variação (%) = 13,3



Terbutrina

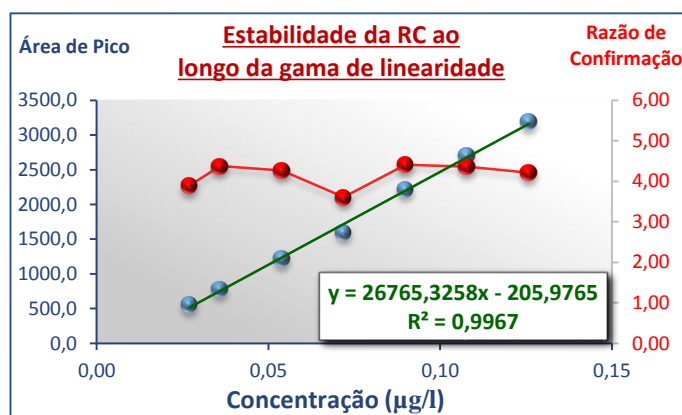
Solvente água:metanol (9:1), com 0,1 mM de acetato de amônio

Média = 4,34
 Desvio padrão = 0,18
 Coeficiente de variação (%) = 4,21



Solvente: água ultrapura

Média = 4,16
 Desvio Padrão = 0,30
 Coeficiente de variação (%) = 7,20

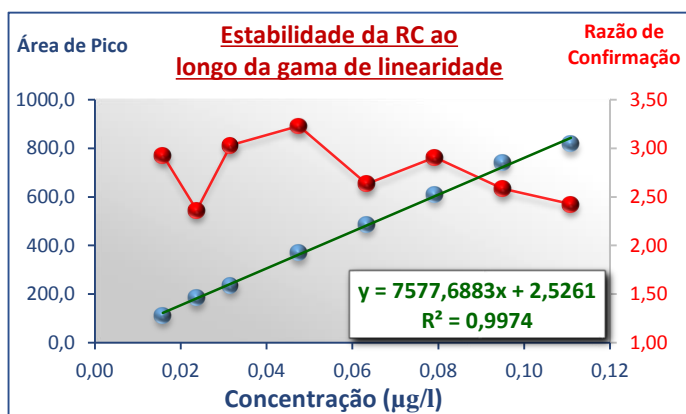


Estabilidade da razão de confirmação

Azoxistrobina

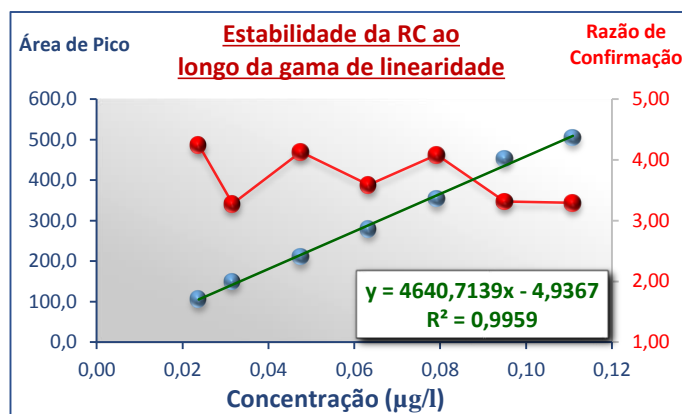
Solvente água:metanol (9:1), com 0,1 mM de acetato de amônio

Média = 2,76
 Desvio padrão = 0,31
 Coeficiente de variação (%) = 11,1



Solvente: água ultrapura

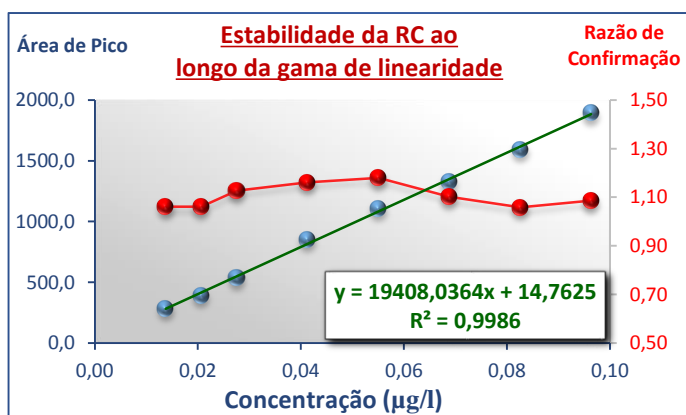
Média = 3,71
 Desvio Padrão = 0,44
 Coeficiente de variação (%) = 11,7



Etoprofos

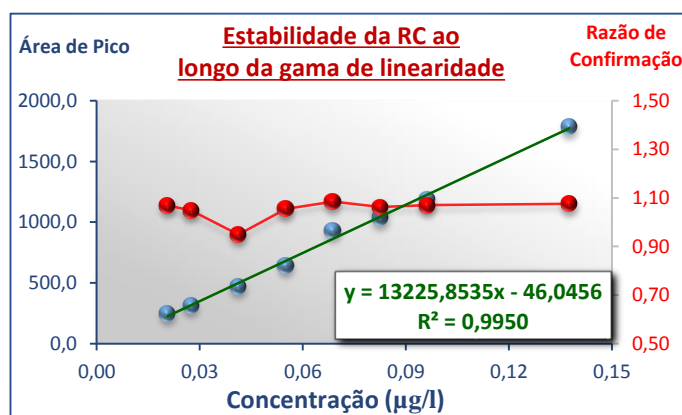
Solvente água:metanol (9:1), com 0,1 mM de acetato de amônio

Média = 1,10
 Desvio padrão = 0,047
 Coeficiente de variação (%) = 4,26



Solvente: água ultrapura

Média = 1,05
 Desvio Padrão = 0,043
 Coeficiente de variação (%) = 4,08

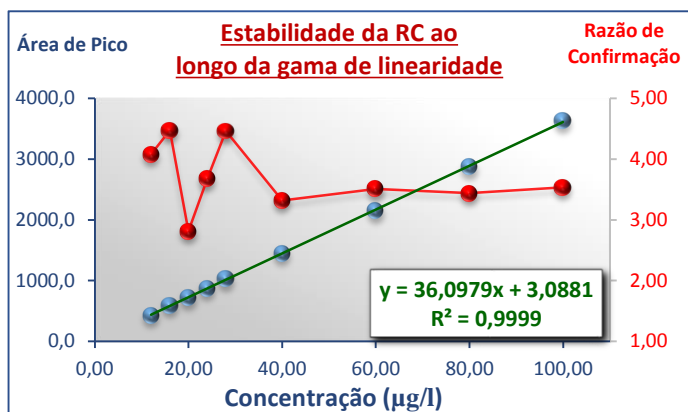


Estabilidade da razão de confirmação

Bifenox

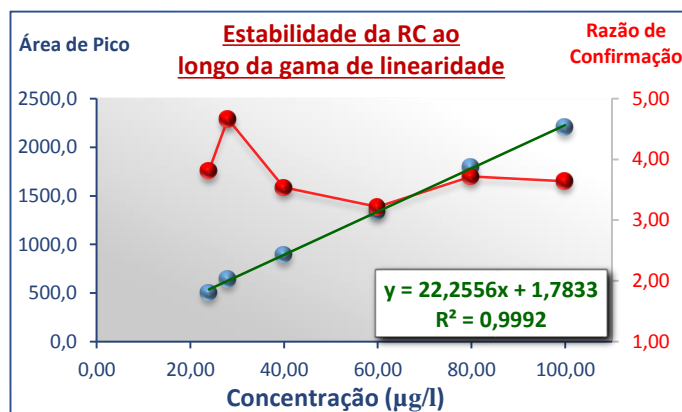
Solvente água:metanol (9:1), com 0,1 mM de acetato de amônio

Média = 3,70
 Desvio padrão = 0,55
 Coeficiente de variação (%) = 14,7



Solvente: água ultrapura

Média = 3,77
 Desvio Padrão = 0,49
 Coeficiente de variação (%) = 12,9



Anexo VIII Teste de Mandel

O teste de Mandel serve para comparar o ajuste dos valores experimentais à curva obtida pela regressão linear e a uma curva de segundo grau, de forma a verificar se a curva da regressão linear é suficientemente satisfatória, e pode ser utilizada em vez da curva de segundo grau.

Assim utiliza-se este teste de modo a verificar a existência de linearidade na gama de trabalho.

Para a execução deste teste começa-se por calcular o desvio padrão residual da representação dos valores experimentais segundo uma função linear (Equação VIII.1) e uma função quadrática (Equação VIII.2).

$$S_{y/x} = \sqrt{\left(\frac{\sum_{i=1}^N (y-y_i)^2}{n-2}\right)} \quad \text{Equação VIII.1}$$

$$S_{y/x(2^{\circ})} = \sqrt{\left(\frac{\sum_{i=1}^N (y-y_i)^2}{n-3}\right)} \quad \text{Equação VIII.2}$$

Onde:

y – valor da área experimental

y_i – valor da área calculada pela equação da regressão da curva respetiva

n – número de padrões

Com estes desvios padrão, calcula-se a diferença das variâncias DS^2 pela Equação VIII.3 e de seguida calcula-se o Valor Teste (VT) pela Equação VIII.4.

$$DS^2 = (N - 2) \times S_{y/x}^2 - (N - 3) \times S_{y/x(2^{\circ})}^2 \quad \text{Equação VIII.3}$$

$$VT = \frac{DS^2}{S_{y/x(2^{\circ})}^2} \quad \text{Equação VIII.4}$$

Para verificar se existe linearidade na gama de trabalho, compara-se este Valor Teste com o valor tabelado da distribuição de F de Fisher-Snedecor, para um grau de confiança de 95,0%, para N-3 valores.

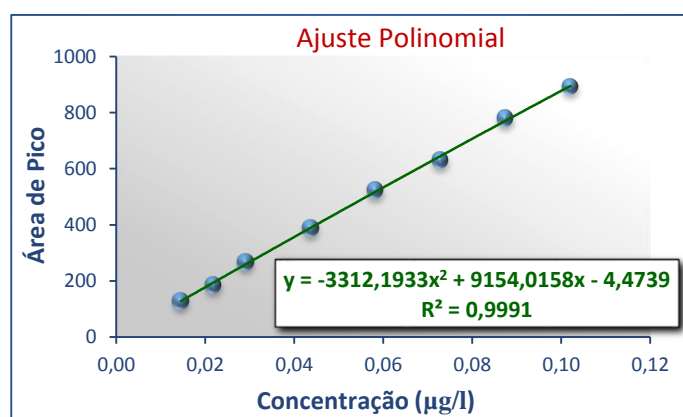
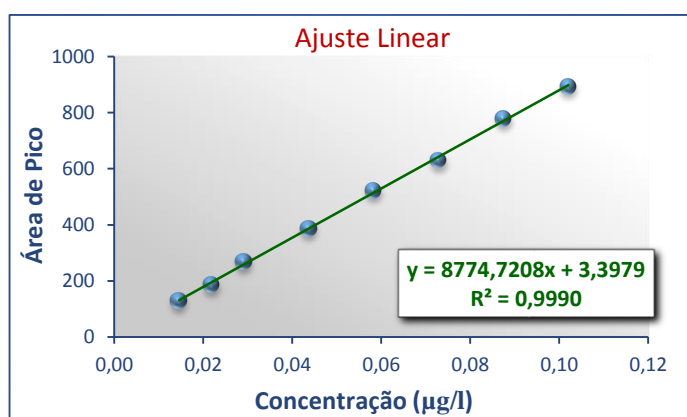
Anexos

Se $VT < F$, considera-se que existe linearidade na gama de concentrações de trabalho; se $VT > F$, considera-se que não existe linearidade na gama de concentrações de trabalho, e esta gama deve ser reduzida de forma a se obter uma gama de trabalho linear.

De seguida apresenta-se um exemplo da aplicação deste teste.

Ometoato

Concentração (µg/l)	Área	Área Ajuste Linear	Área Ajuste Polinomial
0,015	129,1	131,4	128,3
0,022	186,5	195,3	194,2
0,029	268,5	259,3	259,7
0,044	388,1	387,3	389,6
0,058	524,4	515,2	518,2
0,073	631,0	643,2	645,4
0,087	780,8	771,1	771,1
0,102	893,5	899,1	895,4



Ajuste Linear

	$(y-y_i)^2$
	5,082E+00
	7,802E+01
	8,444E+01
	6,932E-01
	8,420E+01
	1,484E+02
	9,338E+01
	3,129E+01
Soma =	5,255E+02
N-2 =	6
S _{y/x} =	9,358E+00

Ajuste Polinomial

	$(y-y_i)^2$
	6,256E-01
	5,886E+01
	7,773E+01
	2,399E+00
	3,837E+01
	2,060E+02
	9,421E+01
	3,706E+00
Soma =	4,819E+02
N-3 =	5
S _{y/x(2°)} =	9,818E+00

DS²= 4,351E+01
VT= 0,45
F_{(1,5)95%}= 6,61

Como VT < F, a função de calibração linear conduz a um bom ajuste dos pontos experimentais.

Anexo IX Teste de Rikilt

O teste de Rikilt serve para verificar a linearidade da curva pela avaliação da dispersão de cada ponto da curva de calibração em relação à curva linear ideal traçada por estes.

Para a avaliação deste teste calcula-se o valor da razão y_i/x_i para i padrões, de acordo com a Equação IX.1, sendo de seguida calculado o valor médio destes, e por fim calculado o valor relativo de cada um destes, de acordo com a Equação IX.2, onde se considera que a média das razões y_i/x_i corresponde a 100 %.

$$\text{Razão } y_i/x_i = \frac{y_i}{x_i} \quad \text{Equação IX.1}$$

$$\% y_i/x_i = \frac{\text{Razão } y_i/x_i}{\text{média das razões } y_i/x_i} \quad \text{Equação IX.2}$$

Onde y é a resposta do equipamento e x é a concentração teórica do padrão i .

Para o teste de Rikilt considera-se que existe linearidade se a razão y_i/x_i apresentar um desvio máximo de $\pm 10\%$ para todos os pontos da gama de trabalho.

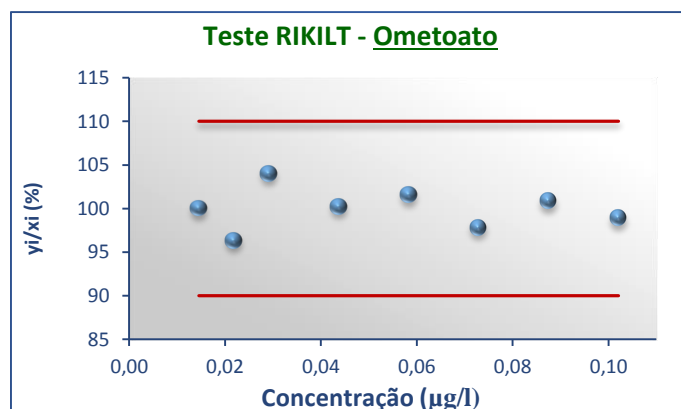
Na tabela e figura seguintes apresenta-se a aplicação deste teste ao pesticida ometoato, bem como a sua representação gráfica. Estando a representação gráfica para os restantes pesticidas a seguir.

Teste de Rikilt (UPLC-MS/MS)

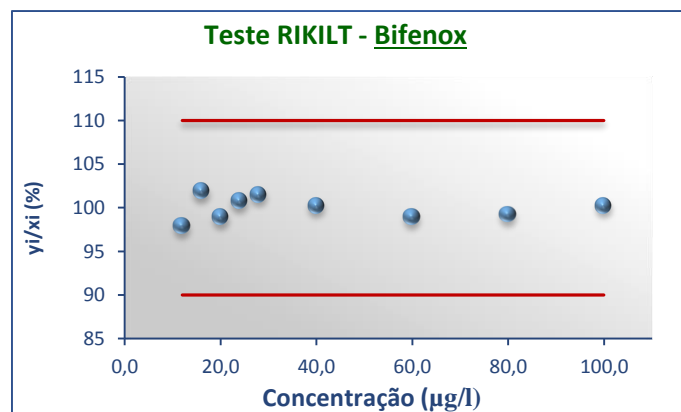
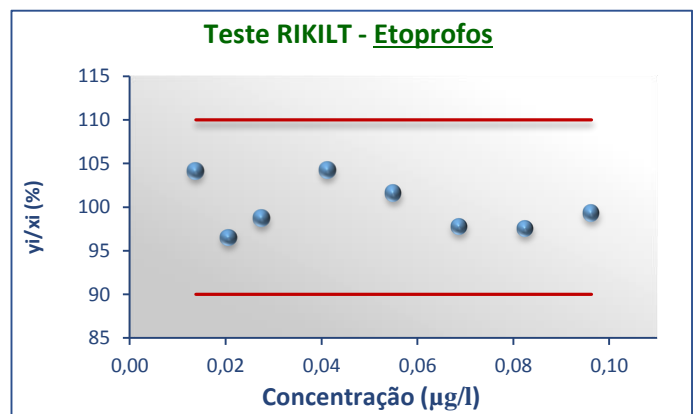
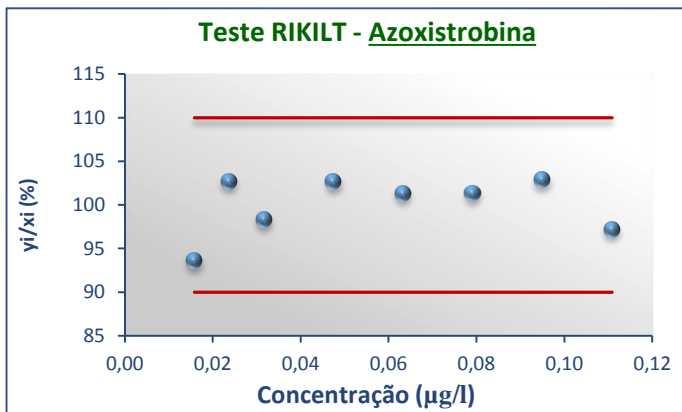
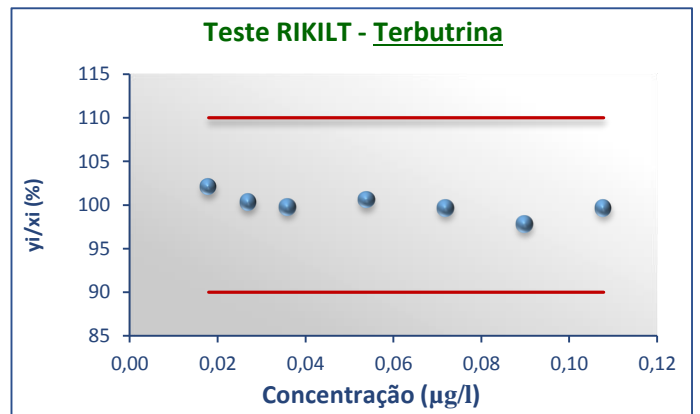
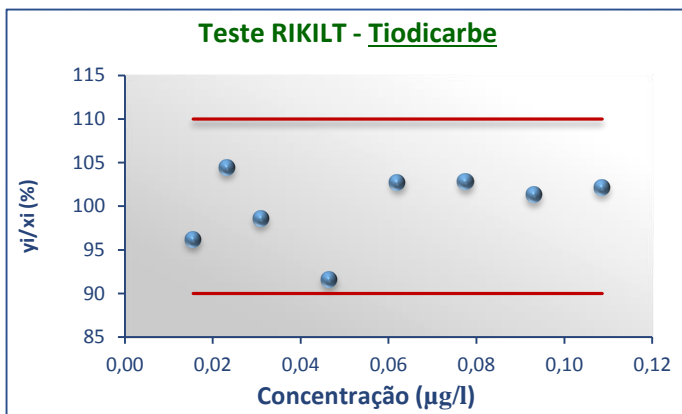
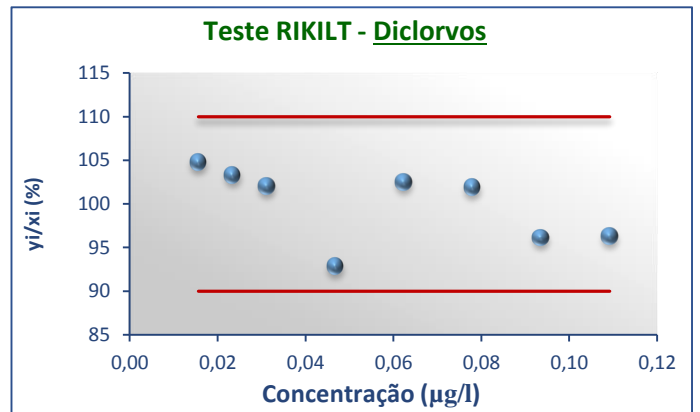
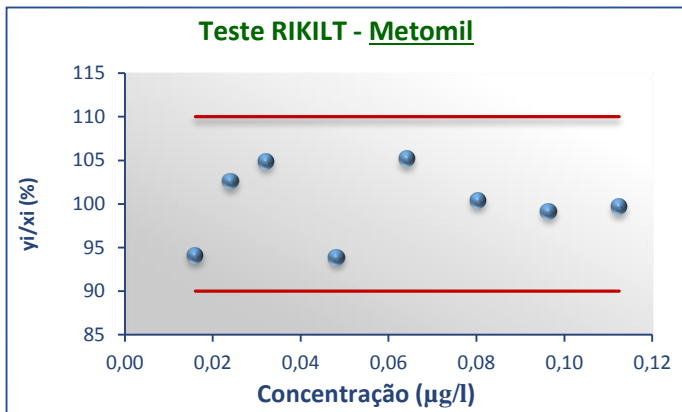
Ometoato

Concentração ($\mu\text{g/l}$) = x_i	Área = y_i	Razão y_i/x_i	% y_i/x_i
0,015	129,1	8853,1	100
0,022	186,5	8526,3	96
0,029	268,5	9206,3	104
0,044	388,1	8871,4	100
0,058	524,4	8990,3	102
0,073	631,0	8654,3	98
0,087	780,8	8924,0	101
0,102	893,5	8753,2	99

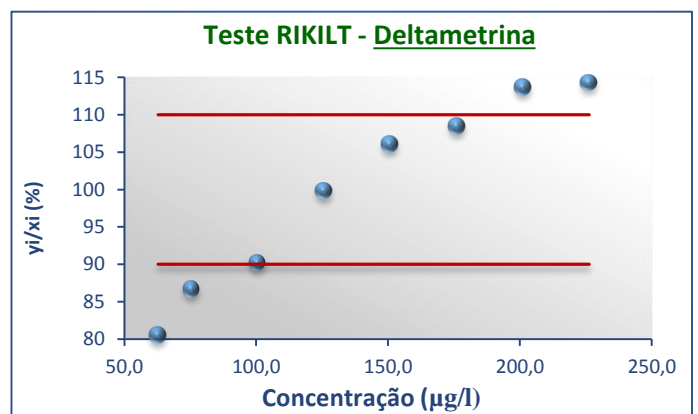
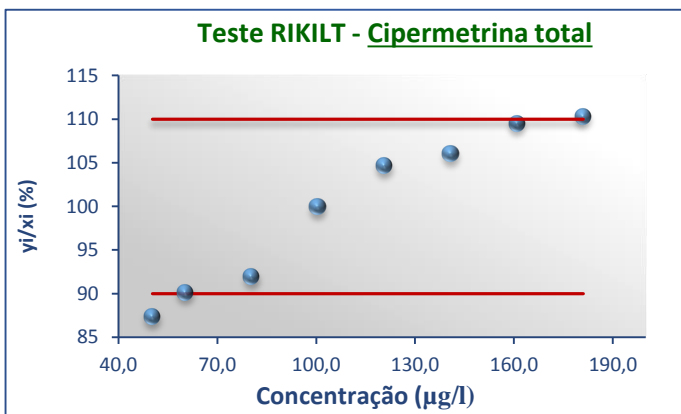
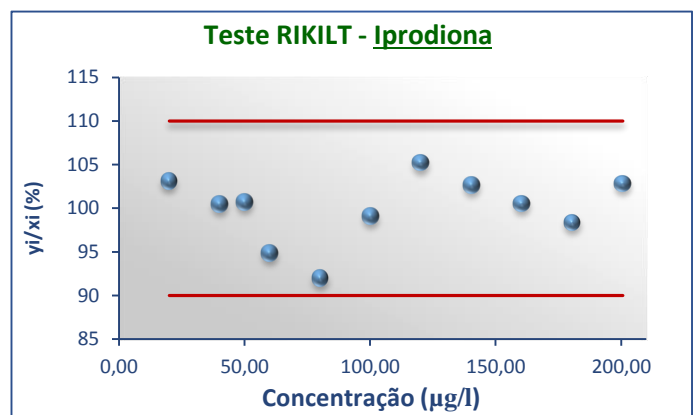
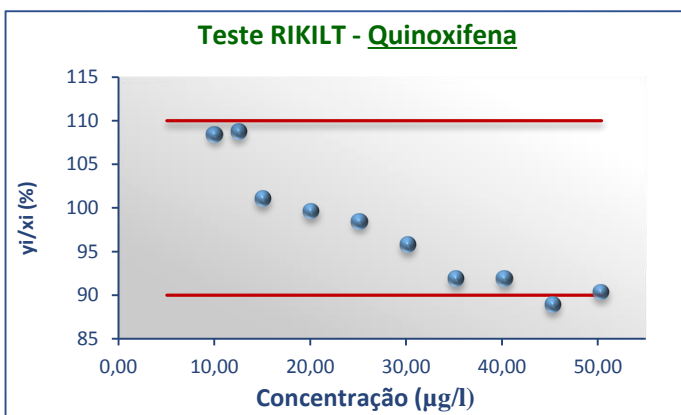
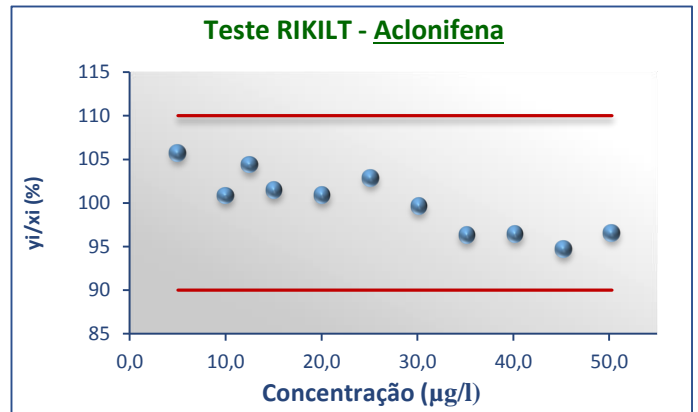
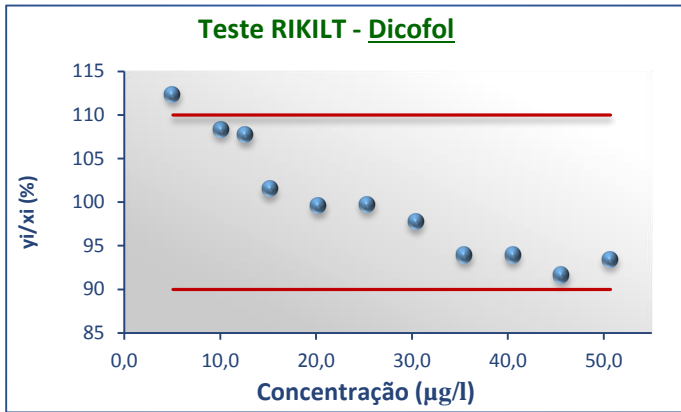
Média da Razão y_i/x_i = 8847,4



Teste de Rikilt (UPLC-MS/MS)



Teste de Rikilt (GC- μ ECD)



Anexo X Teste das Áreas Normalizadas

O teste das áreas normalizadas serve para verificar se existe uniformidade da relação entre as áreas experimentais e as áreas obtidas pela equação da curva da regressão linear, considerando como 100 % o ponto com a melhor razão entre ambas as áreas e utilizando esta área para calcular os valores normalizados destas áreas com a equação:

$$\text{Valores Normalizados} = \frac{C_i \times A_{100}}{A_i \times C_{100}} \times 100 \quad \text{Equação X.1}$$

A_i – Área do pico i

A_{100} – Área do pico considerado 100 %

C_i – Concentração do pico i

C_{100} – Concentração do pico considerado 100 %

Os valores normalizados calculados por esta equação foram representadas sob a forma de um gráfico em função da concentração para se poder melhor observar a sua distribuição, sendo que se considerou como desvio máximo aceitável um desvio de 15 %.

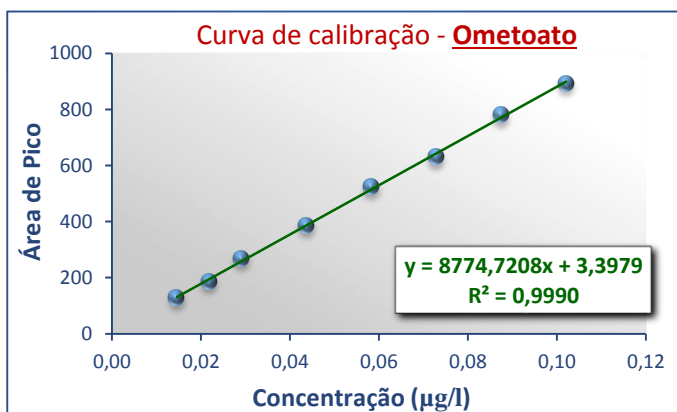
Para além disto este teste serve para verificar se existe alguma tendência dos pontos experimentais ao longo da gama de trabalho, sendo que esta idealmente não deve existir e os pontos experimentais devem distribuir-se de forma aleatória.

Nas tabelas e figuras seguintes apresenta-se a aplicação deste teste ao pesticida ometoato, bem como a sua representação gráfica. Estando a representação gráfica para os restantes pesticidas a seguir.

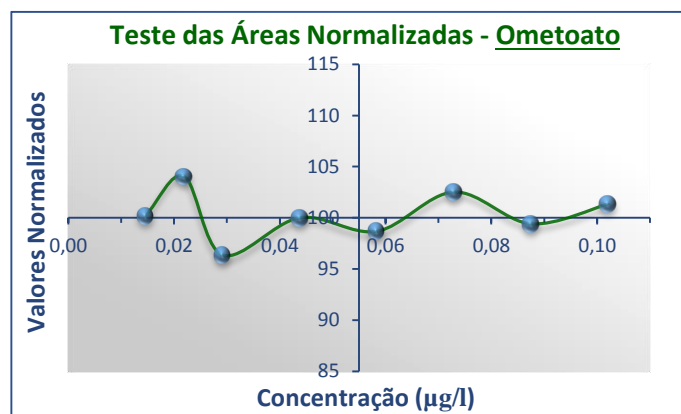
Teste das áreas normalizadas (UPLC-MS/MS)

Ometoato

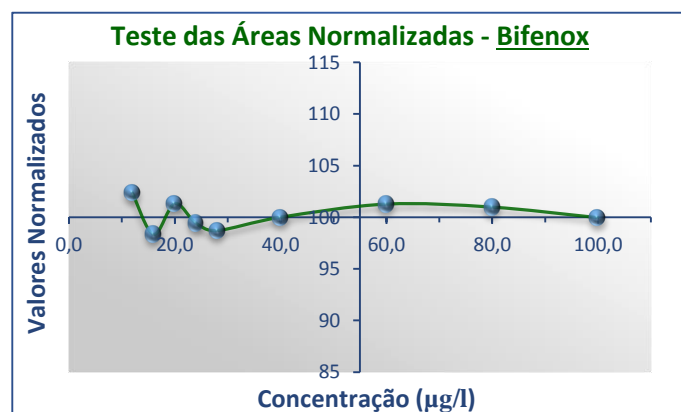
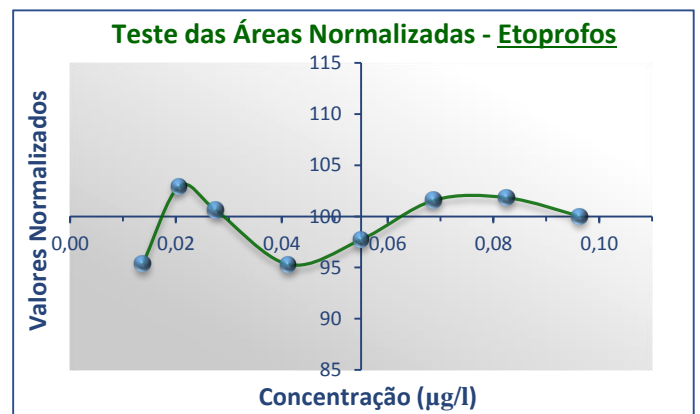
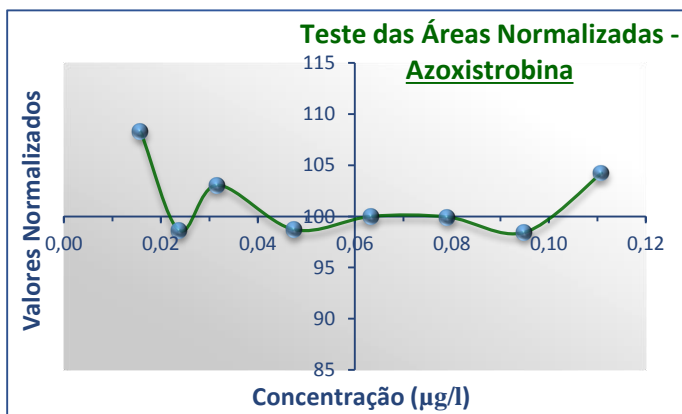
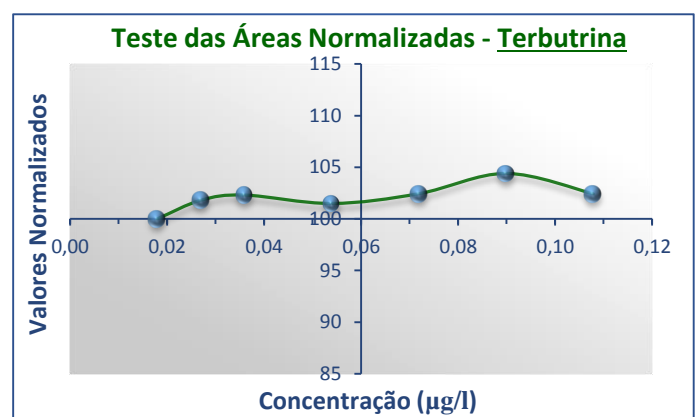
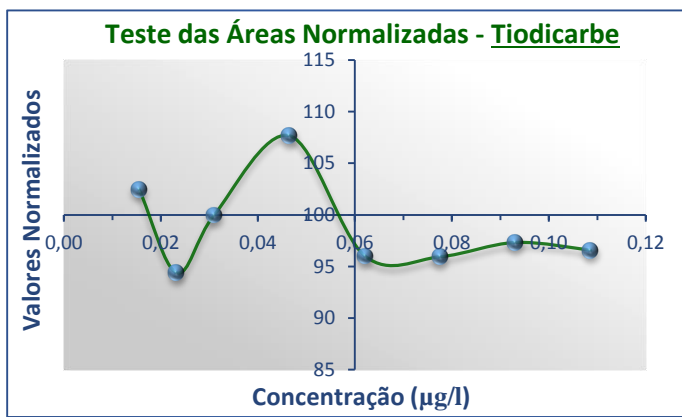
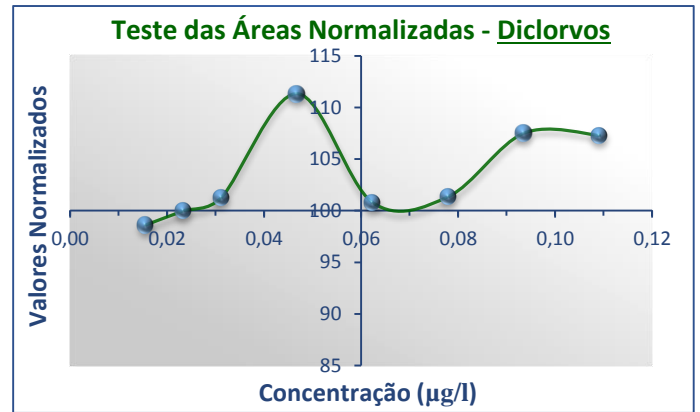
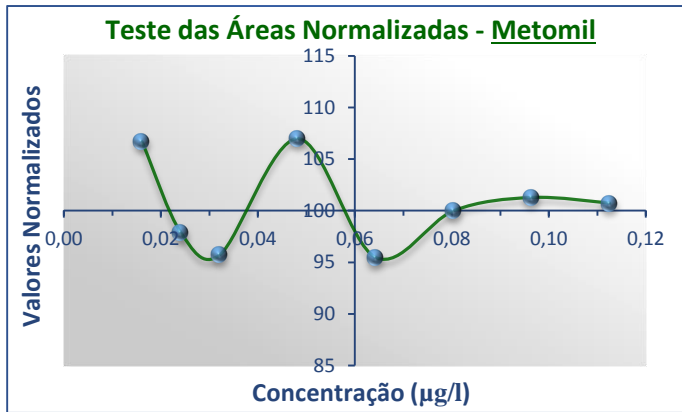
Concentração (µg/l)	Área de Pico
0,015	129,1
0,022	186,5
0,029	268,5
0,044	388,1
0,058	524,4
0,073	631,0
0,087	780,8
0,102	893,5



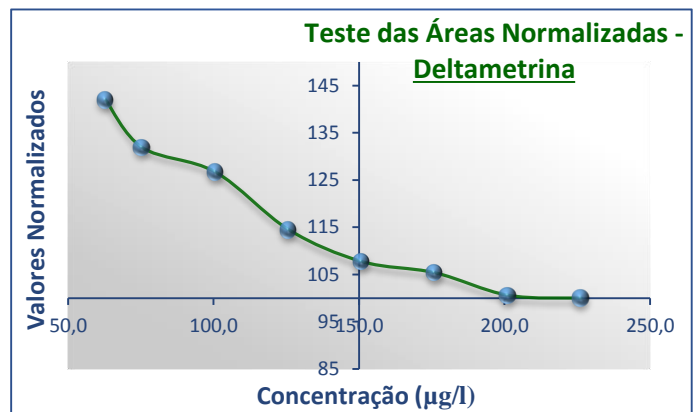
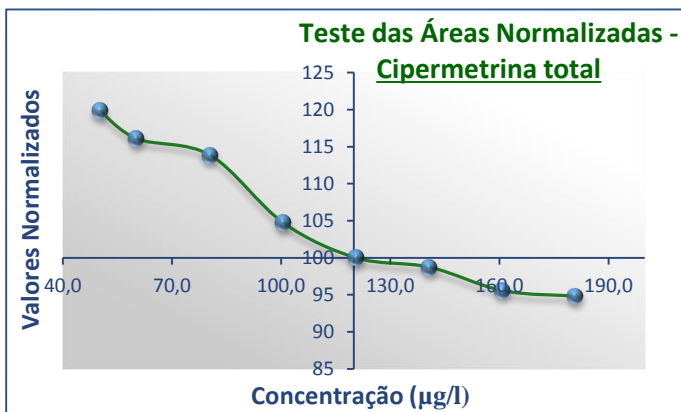
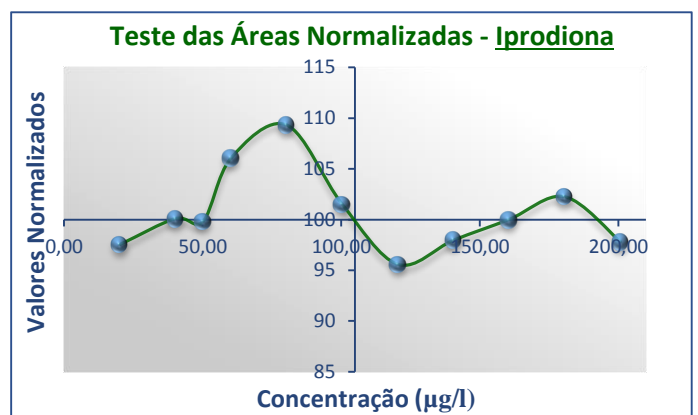
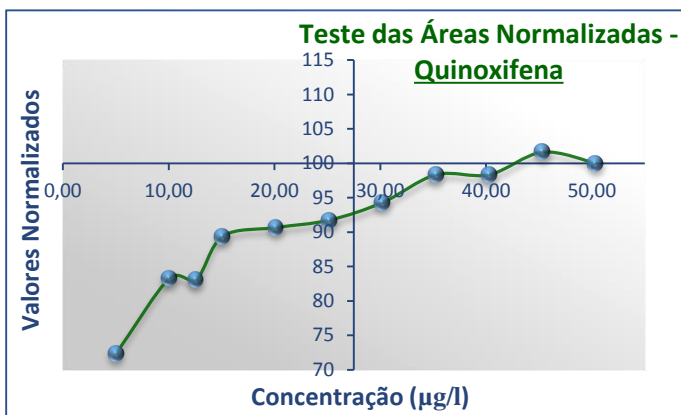
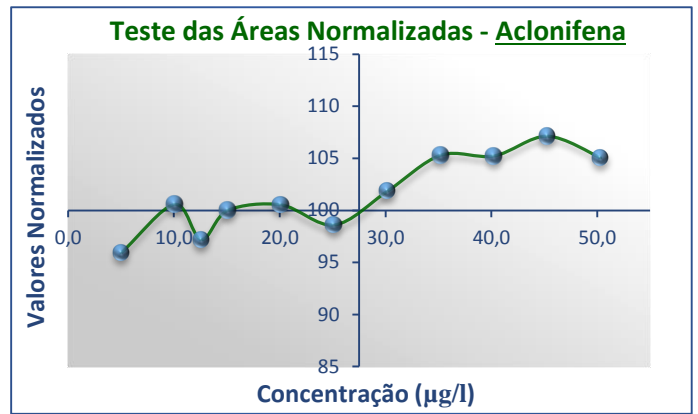
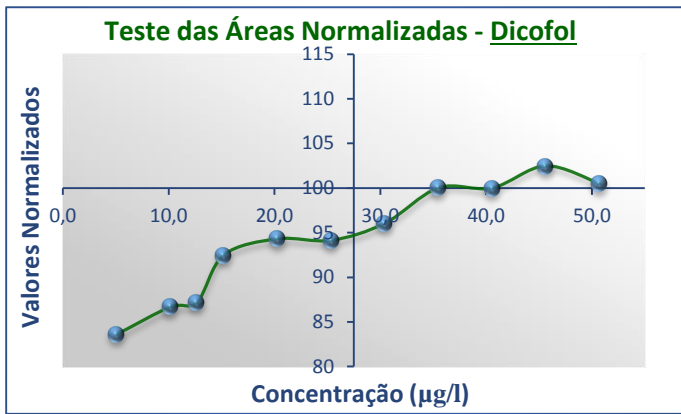
Área de Pico estimada	Área Experimental/Área Estimada	Valores Normalizados
131,4	0,983	100,2
195,3	0,955	104,0
259,3	1,035	96,4
387,3	1,002	100,0
515,2	1,018	98,7
643,2	0,981	102,5
771,1	1,013	99,4
899,1	0,994	101,4



Teste das áreas normalizadas (UPLC-MS/MS)



Teste de Rikilt (GC- μ ECD)



Anexo XI Homogeneidade de Variâncias^[27]

Este método serve para verificar se existe homogeneidade das variâncias ao longo da gama de linearidade. Para executar o teste deve-se fazer pelo menos 10 ensaios (ISO 8466-1) da medição do padrão do limite inferior e superior da gama de trabalho, sendo depois calculado um valor teste (*PG*) com as variâncias destes e comparado com o valor de tabelado da distribuição de F de Snedecor-Fisher para um grau de confiança de 99,0 % e n-1, sendo n o número de ensaios. Neste caso executaram-se 11 a 12 ensaios, sendo o valor tabelado da distribuição de F de Snedecor-Fisher para 11 valores e intervalo de confiança de 99,0 % é de 4,46, e de 4,85 para 10 valores.

A variância foi calculada com recurso à equação:

$$S_t^2 = \frac{\sum_{j=1}^i (y_{i,j} - \bar{y}_t)^2}{n-1} \quad \text{Equação XI.1}$$

Onde $\bar{y}_t = \frac{\sum_{j=1}^i y_{i,j}}{n}$

Sendo i o número do padrão e j o número de repetições.

O valor teste (*PG*), é depois calculado de acordo com:

$$PG = \frac{S_1^2}{S_2^2} \text{ se } S_1^2 > S_2^2 \text{ ou } PG = \frac{S_2^2}{S_1^2} \text{ se } S_2^2 > S_1^2 \quad \text{Equação XI.2}$$

Se $PG < F_{99,0\%}$, então conclui-se que existe homogeneidade de variâncias ao longo da gama de trabalho, o que significa que a gama de concentrações está bem ajustada. Se $PG > F_{99,0\%}$, conclui-se que não existe homogeneidade de variâncias ao longo da gama de trabalho, sendo neste caso necessário reduzir a gama de trabalho.

De seguida apresenta-se um exemplo da aplicação deste teste.

OmetoatoConcentração inferior: 0,015 µg/lConcentração superior: 0,10 µg/l

Área
147,9
144,5
131,5
144,1
127,3
155,0
125,0
145,7
148,6
153,6
141,5
134,2

Área
910,5
969,9
947,1
969,6
945,7
967,6
928,8
971,8
926,4
924,5
942,6
936,6

N-1 = 11
Média = 141,575000
Desvio Padrão = 9,9111622
Desvio Relativo = 7,00 (%)
Variância = 9,8231E+01

N-1 = 11
Média = 945,091667
Desvio Padrão = 20,7893967
Desvio Relativo = 2,20 (%)
Variância = 4,3220E+02

Valor Teste (PG) = s^2_1 / s^2_2 se $s^2_1 > s^2_2$ ou $PG = s^2_2 / s^2_1$ se $s^2_2 > s^2_1$

F_{99%} = 4,46

PG = 4,40

Conclusão

Uma vez que PG é **INFERIOR** ao F, pode afirmar-se que **EXISTE** homogeneidade de variâncias na gama de trabalho estudada

Anexo XII Limiares analíticos^[27]

Os limiares analíticos são de elevada importância na validação de métodos para análise vestigial.

O limite de deteção (*LOD*) é a quantidade mais pequena que se consegue identificar com um elevado nível de confiança. Pode ser obtido experimentalmente, considerando-o como a concentração à qual se obtém uma razão sinal/ruído de pelo menos 3 vezes, ou pode ser calculado com recurso a ensaios de repetibilidade de um padrão no extremo inferior da gama de trabalho, sendo neste caso o *LOD* obtido com recurso à Equação XII.1.

O limite de quantificação (*LOQ*) é quantidade mais pequena que se consegue quantificar com um elevado grau de confiança. À semelhança do *LOD*, o *LOQ* pode ser obtido experimentalmente, considerando-o como igual à concentração para a qual se obtém uma razão sinal/ruído de pelo menos 10, ou calculado com recurso a dados de precisão de um padrão no limite inferior da gama de trabalho, sendo calculado com recurso à Equação XII.2.

$$LOD = 3 \times S_{x0} \quad \text{Equação XII.1}$$

$$LOQ = 10 \times S_{x0} \quad \text{Equação XII.2}$$

Onde S_{x0} é o desvio padrão de leituras repetidas de um branco ou padrão correspondente ao limite inferior da gama de trabalho.

De seguida apresenta-se um exemplo da aplicação deste teste.

Determinação do Limite de Detecção
e Limite de Quantificação

Ometoato

Concentração inferior da Gama de Linearidade ($\mu\text{g/l}$) = 0,0146

Área de Pico MRM 1	Área de Pico MRM 2	Relação das Intensidades MRM1/ MRM2	Concentração pela equação da curva ($\mu\text{g/l}$)
147,9	83,7	1,767	0,0165
144,5	81,4	1,775	0,0161
131,5	83,4	1,577	0,0146
144,1	85,9	1,678	0,0160
127,3	70,7	1,801	0,0141
155,0	79,8	1,942	0,0173
125,0	87,2	1,433	0,0139
145,7	72,7	2,004	0,0162
148,6	65,2	2,279	0,0165
153,6	71,8	2,139	0,0171
141,5	81,9	1,728	0,0157
134,2	84,0	1,598	0,0149

Média da Relação das Intensidades = 1,810

Desvio Padrão = 0,244

CV (%) = 13,46

Dados da curva de calibração

Declive (concentração, $\mu\text{g/l}$) = 8774,72

Ordenada na Origem (área) = 3,3979

Coefficiente de Determinação (r) = 0,9995

Média das Concentrações ($\mu\text{g/l}$) = 0,0157

Desvio Padrão ($\mu\text{g/l}$) = 0,00113

CV (%) = 7,17

ERRO RELATIVO = 7,99 %

Limite de Detecção = 0,00339 ($\mu\text{g/l}$)

Limite de Quantificação = 0,0113 ($\mu\text{g/l}$)

Anexo XIII Incerteza global do método analítico^{[28][29]}

A incerteza global do método analítico pode ser calculada passo a passo pela lei da propagação de erros, para o que é necessário averiguar todas as fontes de incerteza e quantificá-las. Pode também ser calculada de forma direta por ensaios de recuperação, de acordo com o método Nordtest.

Para o cálculo da incerteza global do método com base na propagação de erros utilizou-se a incerteza associada à preparação dos padrões de calibração, a incerteza associada à interpolação na curva de calibração e a incerteza associada aos dados de ensaios de precisão.

Anexo XIII.1 Incerteza dos padrões de calibração

Uma vez que esta é a componente da incerteza onde está a grande maioria de passos de manipulação de padrões, esta também é a componente que reúne a maior parte das fontes primárias de incerteza, ou seja as várias componentes de incerteza introduzidas na pesagem das massas do padrão comercial, e na medição de volumes para aferir balões e preparar diluições.

Anexo XIII.1.1 Incerteza padrão associada à pesagem do padrão comercial

A pesagem do padrão comercial é afetada por vários fatores, sendo estes a incerteza da pureza dos padrões comerciais e os vários fatores de incerteza inerentes à pesagem sob a forma do erro máximo admissível da balança (*e.m.a.*).

Para calcular a incerteza padrão associada ao valor da pureza dos padrões comerciais dos pesticidas assume-se uma distribuição retangular da impureza do padrão comercial, sendo o cálculo desta feito através da seguinte equação:

$$u(pur) = \frac{Tolerância}{\sqrt{3}} \quad \text{Equação XIII.1}$$

Onde:

$u(pur)$ – Incerteza padrão associada à pureza do padrão comercial

Tolerância – Teor de impureza do padrão comercial, segundo o certificado de qualidade do mesmo.

O cálculo da incerteza inerente à pesagem é feito com recurso ao valor do erro máximo admissível (*e.m.a.*) para a balança, sendo a incerteza associada à calibração da balança calculada por:

$$u'(m) = u(tara) = \sqrt{\left(\frac{e.m.a.}{\sqrt{3}}\right)^2} \quad \text{Equação XIII.2}$$

$u'(m)$ e $u(tara)$ – incerteza padrão do certificado de calibração da balança na zona da tara e na zona de trabalho, respetivamente (mg)

e.m.a. – Erro máximo admissível ou especificação da balança, quer na tara como na zona de trabalho (mg).

A incerteza padrão associada à pesagem é dada por:

$$u(m) = \sqrt{\left(\frac{e.m.a.}{\sqrt{3}}\right)_{tara}^2 + \left(\frac{e.m.a.}{\sqrt{3}}\right)_{toma}^2} \quad \text{Equação XIII.3}$$

$u(m)$ – Incerteza padrão associada à pesagem (mg).

Anexo XIII.1.2 Incerteza padrão associada ao volume utilizado para a preparação da solução padrão primária

O cálculo da incerteza padrão inerente ao volume utilizado para a preparação da solução padrão primária é feito tendo em conta a incerteza padrão associada ao volume do material volumétrico e à incerteza associada ao efeito da temperatura no volume de solvente.

A incerteza padrão associada à calibração do material volumétrico é calculada com base no valor de tolerância do mesmo, fornecido pelo fabricante, assumindo-se uma distribuição retangular para o cálculo da incerteza padrão associada ao volume. A incerteza padrão associada ao volume do balão volumétrico pode ser calculada com a equação seguinte:

$$u'(V) = \frac{\text{Tolerância (Balão/pipeta)}}{\sqrt{3}} \quad \text{Equação XIII.4}$$

$u'(V)$ – Incerteza padrão associada ao volume (ml)

Tolerância – Tolerância do material de volumétrico (ml)

Anexos

A incerteza padrão associada à medição do volume de solvente com a temperatura pode ser calculada com recurso a:

$$u_{efT} = \frac{V_b \times \Delta T \times Coef_{Exp}}{\sqrt{3}} \quad \text{Equação XIII.5}$$

u_{efT} – Incerteza padrão associada ao efeito da temperatura no volume de solvente (ml)

V_b – Volume do balão volumétrico (ml)

ΔT – Variação de temperatura do laboratório (°C)

$Coef_{Exp}$ – Coeficiente de expansão volumétrico do solvente (°C⁻¹)

Sendo a incerteza padrão associada ao volume dada por:

$$u(V) = \sqrt{u'(V)^2 + u_{efT}^2} \quad \text{Equação XIII.6}$$

Com as incertezas padrão anteriores pode-se calcular a incerteza padrão associada à preparação da solução padrão primária com recurso à equação:

$$u(C) = C \times \sqrt{\left(\frac{u(pur)}{pur}\right)^2 + \left(\frac{u(m)}{m}\right)^2 + \left(\frac{u(V)}{V_b}\right)^2} \quad \text{Equação XIII.7}$$

$u(C)$ – Incerteza padrão associada à concentração da solução padrão primária (mg/l)

C – Concentração da solução padrão primária (mg/l)

$u(pur)$ – Incerteza padrão associada à pureza do padrão comercial

pur – Pureza do padrão comercial em valor nominal

$u(m)$ – Incerteza padrão associada à pesagem do padrão comercial (mg)

m – massa pesada do padrão comercial (mg)

$u(V)$ – Incerteza padrão associada ao volume da solução padrão primária (ml)

V_b – Volume do balão volumétrico (ml)

Anexo XIII.1.3 Incerteza padrão associada à preparação das soluções intermédias e de calibração

A necessidade de se fazerem diluições da solução padrão primária para preparar soluções de calibração faz com que exista a propagação do erro associado à preparação da solução padrão primária, com cada diluição sucessiva. Esta propagação de incerteza também pode ser calculada e é utilizada no cálculo da incerteza padrão combinada final do método. Para este efeito utiliza-se a equação:

$$u(C1) = C1 \times \sqrt{\left(\frac{u(C)}{C}\right)^2 + \left(\frac{u(V1)}{V1}\right)^2 + \left(\frac{u(V2)}{V2}\right)^2} \quad \text{Equação XIII.8}$$

$u(C1)$ – Incerteza padrão associada à diluição (solução padrão intermédia) (mg/l)

$C1$ – Concentração da solução diluída (solução padrão intermédia) (mg/l)

$u(C)$ – Incerteza padrão da solução padrão anterior (mg/l)

C – Concentração do padrão anterior (mg/l)

$u(V1)$ – Incerteza padrão da pipeta (ml)

$V1$ – Volume pipetado (ml)

$u(V2)$ – Incerteza padrão associada ao volume do balão volumétrico

$V2$ – Volume do balão volumétrico

Para calcular a incerteza padrão da solução padrão de calibração calcula-se a incerteza padrão associada à preparação do padrão de concentração inferior, uma vez que este será o que apresenta uma maior incerteza. Para este efeito utiliza-se novamente a equação anterior para cada passo de diluição que existir até à preparação da solução padrão de calibração de concentração inferior.

Esta incerteza pode ser expressa em percentagem, sendo calculada de acordo com a equação:

$$u'(Ci) = \frac{u(Ci)}{Ci} \times 100 \quad \text{Equação XIII.9}$$

Sendo:

$u'(Ci)$ – Incerteza padrão associada à preparação da solução padrão i (%)

$u(C_i)$ – Incerteza padrão associada à preparação da solução padrão i (mg/l)

C_i – Concentração da solução padrão i (mg/l).

Anexo XIII.2 Incerteza associada à interpolação na curva de calibração

Uma vez que as leituras obtidas pelo equipamento para uma dada concentração não são valores fixos mas uma dispersão em torno de um ponto, existe sempre um erro quando interpolando uma curva de calibração linear obtida pelo método de regressão linear para quantificar uma amostra. Esta incerteza u_{curva} pode ser calculada através de:

$$u_{curva} = \left(\frac{S_{y/x}}{b}\right) \times \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{y}_{lid} - \bar{y})^2}{b^2 \times \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Equação XIII.10}$$

Onde:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - (a + bx_i))^2}{N - 2}} \quad \text{Equação XIII.11}$$

$S_{y/x}$ – desvio padrão da curva de calibração

b – declive da curva de calibração

N – Número de padrões de calibração utilizados para traçar a curva de calibração

n – Número de leituras do padrão de concentração mais baixo

\bar{y}_{lid} – Valor médio das leituras das amostras

\bar{y} – Valor médio das leituras da curva de calibração

x_i – Concentração de cada padrão de calibração

\bar{x} – Média da concentração dos padrões da curva de calibração

a – Ordenada na origem da curva de calibração

y_i – Resposta do equipamento para cada padrão de calibração

Anexo XIII.3 Precisão intermédia do método.

Esta incerteza visa avaliar a variabilidade das condições do laboratório numa aproximação ao trabalho em rotina, sendo calculada com recurso aos padrões de controlo de várias sequências. A incerteza da precisão intermédia é dada por:

$$u(\textit{precisão}) = \frac{S}{\bar{C} \times \sqrt{N}} \times 100 \quad \text{Equação XIII.12}$$

$u(\textit{precisão})$ – Incerteza associada aos padrões de controlo (%)

S – Desvio padrão da recuperação (mg/l)

\bar{C} – Média das concentrações (mg/l)

N – Número de análises

Anexo XIII.4 Incerteza global do método

Com base em todas as incertezas anteriores é possível calcular a incerteza combinada do método através da seguinte equação:

$$u_c = \sqrt{u_{\textit{curva}}^2 + u'(Ci)^2 + u(\textit{precisão})^2} \quad \text{Equação XIII.13}$$

u_c – Incerteza combinada do método

$u_{\textit{curva}}$ – Incerteza associada à interpolação na curva de calibração

$u'(Ci)$ – Incerteza associada ao padrão de calibração de concentração mais baixa

$u(\textit{precisão})$ – Incerteza associada à precisão intermédia

Normalmente não se reporta a incerteza como um valor absoluto, mas sim como uma incerteza expandida (U), esta é a incerteza combinada multiplicada por um fator de cobertura, k . Tendo-se utilizado o fator de cobertura 2, que corresponde a um intervalo de confiança de 95 %.

$$U = u_c \times k \quad \text{Equação XIII.14}$$

Anexo XIV Segurança e ambiente

O tipo de trabalho realizado nos laboratórios da EPAL é de alta precisão, e envolve diversos reagentes químicos perigosos tanto para o homem como para o ambiente, estando o laboratório munido com sistemas de segurança para proporcionar o bem-estar dos profissionais, evitar o risco de acidentes, bem como de um sistema integrado de desenvolvimento organizacional de recolha de resíduos.

Os locais de trabalho estão equipados com um de sistema ventilação, iluminação e limpeza adequados, estando o ambiente das várias salas termostaticado de forma a manter uma temperatura constante no laboratório ao longo do tempo.

Para a manipulação e armazenamento dos diversos químicos estão disponíveis *hottes* onde se procedeu à manipulação dos solventes e padrões ao longo do trabalho, frigoríficos estanques para o armazenamento de padrões de pesticidas e armários com ventilação para o armazenamento de solventes. Também foram utilizados equipamentos de proteção individuais, tendo estes consistido de bata, óculos, luvas. Quando se manipularam padrões comerciais para pesagem recorreu-se ainda a máscara de proteção e 2 pares de luvas para proteção acrescida, devido ao perigo mais elevado que estes padrões proporcionam.

De forma a garantir a boa qualidade dos resultados obtidos durante o trabalho experimental todo o material de vidro foi submetido a um cuidadoso processo de lavagem e descontaminação.

Os sistemas de segurança do laboratório são constituídos por: lava-olhos, chuveiros e extintores de incêndio em cada sala de manuseamento de substâncias químicas; caixas de primeiros socorros em locais bem identificados; um sistema de alarme e deteção de incêndios e um sistema automático de deteção de gases para garantir a segurança em caso de fuga, estando ambos ligados a um sistema de controlo de portas de corta-fogo/retenção de gases.

Em termos de medidas de gestão de resíduos, todos os resíduos sólidos e líquidos produzidos durante o trabalho laboratorial são separados, como resíduos sólidos químicos, solventes halogenados, solventes não halogenados, ácidos, materiais adsorventes e material de vidro contaminado. Todos estes resíduos depois de recolhidos em recipientes adequados e identificados são armazenados provisoriamente no ECOLAB

Anexos

(armazém específico de resíduos), sendo posteriormente reencaminhados para tratamento por uma empresa licenciada para o efeito.

Mais especificamente, ao longo deste trabalho foram produzidos vários resíduos, sendo os produtos químicos utilizados para a preparação dos funis considerados resíduos químicos sólidos, os diversos solventes utilizados considerados como solventes não halogenados ou halogenados, sendo que todas as soluções padrão de calibração foram tratadas como resíduos não halogenados, mesmo quando preparadas totalmente em água, devido à elevada concentração de pesticidas presente. Para além destes, foram produzidos diversos resíduos sob a forma de adsorventes contaminados como as luvas, seringas de plástico e filtros e resíduos de vidro contaminado, como pipetas de Pasteur, *vials* e recipientes de pesticidas comerciais.

A maioria deste material de plástico e vidro é descartado imediatamente após a utilização para evitar contaminações das instalações no caso de luvas, e de amostras ou padrões no caso de *vials*, pipetas de Pasteur e seringas de plástico.

Anexo XV Análise de custos

Para a realização deste trabalho foi necessária a compra de padrões comerciais dos diversos pesticidas abordados, e uma vez que não se adquiriram para uso em cada uma das técnicas em separado, manter-se-ão como um custo separado do restante processo de validação dos métodos analíticos.

Todos os solventes, gases e químicos sólidos fazem parte do uso corrente do laboratório, tornando-se difícil de averiguar com exatidão a quantidade utilizada destes, como tal, esta avaliação será feita como a melhor estimativa de custos possível. No entanto não se considerará o custo do material corrente de laboratório, bem como alguns custos operacionais dos equipamentos.

Todos os preços apresentados são referentes ao preço unitário ou por embalagem, sem a aplicação de IVA, conforme os preços apresentados em guias de entrega ou caso estas não apresentem preços, nas páginas da internet dos fornecedores.

A apresentação de custos final não será afetada da quantidade de cada material ou substância gasta quando esta é inferior à unidade. Isto pode levar a uma sobre estimativa dos custos, no entanto se estes não fizessem parte do grupo de substâncias e materiais de uso corrente das várias áreas do laboratório ou excedentes de trabalhos desenvolvidos anteriormente, ter-se-iam de adquirir à unidade, e o excedente não utilizado ao longo do trabalho, mesmo sendo armazenado, seria gasto inerente ao trabalho.

Tabela XV.1 Padrões comerciais de pesticidas utilizados.

Pesticida	Quantidade (/unidade)	Preço (€/unidade)	Unidades
Aclonifena	0,25 g	55,62	1
Azoxistrobina	0,1 g	122,00	1
Bifenox	0,25 g	48,15	1
alfa-Cipermetrina	0,1 g	70,65	1
beta-Cipermetrina	0,1 g	70,65	1
teta-Cipermetrina ¹	Frasco de 10 ml, a 10 mg/l, em ciclohexano	284,40	2
		229,08	2
zeta-Cipermetrina	0,1 g	95,40	1
Deltametrina	0,25 g	110,00	1
Diclorvos	0,25 g	40,59	1
Dicofol	0,1 g	67,68	1
Etoprofos	0,1 g	83,00	1
Iprodiona	0,1 g	83,00	1
Metomil	0,1 g	75,50	1
Ometoato	0,1 g	48,15	2
Quinoxifena	0,1 g	109,80	1
Terbutrina	0,25 g	63,18	1
Tiodicarbe	0,1 g	95,00	1
Total		2313,48	

¹Adquirido de 2 fornecedores diferentes.

O custo total em padrões de pesticidas foi aproximadamente 2300 € tendo estes sido utilizados em ambas as técnicas. De forma geral apenas se utilizou 20-40 mg de cada pesticida, com exceção do pesticida ometoato para o qual houve perda total de uma embalagem devido à forma como se tentou preparar a primeira solução padrão primária deste. Exceção foi também o pesticida teta-cipermetrina, que devido a ser comercializado como uma solução muito diluída foi adicionado diretamente à solução intermédia sempre que esta se preparou, o que fez com que se tenha utilizado uma maior quantidade deste padrão comercial.

Tabela XV.2: Custos associados exclusivamente ao desenvolvimento do método de UPLC-MS/MS.

Operação do UPLC-MS/MS e preparação de solventes		
	Preço (€/unidade)	Quantidade (unidades)
Coluna	693,00	1 coluna
Vials UPLC	178,00	5 caixas (100 vials)
Ácido Fórmico 98-100%	39,20	1 garrafa de 1 l
Metanol	15,00	8 garrafas de 2,5 l
Acetato de amónio	57,20	1 caixa (500 g)
Árgon 6.0	64,06	1 garrafa
Preparação de amostras		
Seringa de plástico	6,90	1 caixa (100 seringas)
Filtro GHP Acrodisc	171,90	1 caixa (100 filtros)
Fibra de vidro	44,17	1 caixa (100 discos)
Filtro IC Acrodisc	237,40	1 caixa (100 filtros)
Nylaflo membrane filter	199,00	1 caixa (100 discos)
Filtro Regenerated Cellulose	138,90	1 caixa (50 filtros)
Total	2661,73	

O custo de operação do UPLC-MS/MS e validação do método foi de cerca de 2700 €. O tempo de utilização do equipamento não está contabilizado, apenas se tendo considerado o custo de uma garrafa de árgon, sendo este superior à quantidade de árgon utilizado, e o custo dos solventes da fase móvel e solventes de lavagem, estando estes junto com os solventes utilizados para a preparação das curvas de calibração.

Durante todo o estudo utilizaram-se muitos *vials* e seringas, estando as quantidades estimadas na Tabela XV.2, sendo que apenas se utilizaram 3-4 filtros dos vários tipos durante o estudo do processo de filtração, no entanto conta-se com o custo de uma caixa de cada tipo de filtros.

Tabela XV.3: Custos associados exclusivamente ao desenvolvimento do método de GC-ECD.

Operação do GC-ECD			
	Preço (€/unidade)	Quantidade (unidades)	
Coluna cromatográfica Phenomenex Zebron	555,30	2 colunas	
Coluna cromatográfica Agilent Technology HP-5MS	581,91	1 colunas	
Hélio	165,80	1 garrafa	
Argon-Metano	168,30	1 garrafa	
Preparação de solventes e amostras			
Vials GC	12,80	4 caixas (100 vials)	
Tampas para vials	28,60	4 sacos (100 tampas)	
Acetona	24,31	5 garrafas de 2,5 l	
n-Hexano	80,40	1 garrafa de 2,5 l	
Diclorometano	21,72	2 garrafas de 2,5 l	
Metanol	15,00	1 garrafa de 2,5 l	
Cobre em pó fino	50,00	1 caixa (250 g)	
Florisil®	116,90	1 caixa (1 kg)	
Sulfato de sódio anidro	26,40	1 caixa (1 kg)	
Tiosulfato de sódio pentahidratado	14,74	1 caixa (500 g)	
Azoto 5.2 BIP	42,33	1 garrafa	
Cartuchos SPE	Chromabond HR-P	–	1 caixa de 30 cartuchos
	Isolute C18 (EC)	206,00	5 caixas de 30 cartuchos
	Oasis HLB	187,00	2 caixas de 30 cartuchos
Total	4106,97		

O custo de operação do GC-ECD e validação do método foi de aproximadamente 4500 €. O tempo de utilização do equipamento não está contabilizado, apenas se tendo considerado o custo de uma garrafa de argon-metano, e hélio. A necessidade de adquirir uma segunda coluna cromatográfica Phenomenex Zebron deveu-se à primeira coluna começar a demonstrar problemas de estabilidade, possivelmente devido ao elevado número de injeção de padrões realizada para definir e validar a gama de linearidade.

O custo do diclorometano engloba tanto a o ensaio deste como solvente quanto o uso deste nos métodos de extração estudados, o metanol aqui apresentado deve-se ao seu uso no método de SPE. A não apresentação do preço dos cartuchos Chromabond HR-P deve-se a estes fazerem parte de um grupo de excedentes de um trabalho anterior, e não ter sido possível adquirir o custo dos mesmos em tempo útil, tendo apenas se utilizado 12 cartuchos destes.