

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**Desenvolvimento de um Método Multiresíduo para a Análise de
Pesticidas em Alimentos de Alto Teor em Gordura por GC-
MS/MS na SGS Portugal**

Viviana Valente Leandro

Mestrado em Química Tecnológica

Dissertação orientada por:
Doutora Andreia Marques Valente e Doutora Marta Sousa Silva

Supervisor: Mestre Vera Cristina Calção Canelas

AGRADECIMENTOS

A conclusão desta dissertação de Mestrado marca o fim de uma etapa muito importante na minha vida, mas também o início de novas oportunidades e conquistas, que só foi possível graças a pessoas incríveis com a qual tive a oportunidade de partilhar esta experiência e gostaria de agradecer.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à Professora Maria José Lourenço, coordenadora do Mestrado em Química Tecnológica, por desencadear esta oportunidade de estágio na SGS Portugal e por ter acreditado sempre nas minhas capacidades.

Às minhas orientadoras, Doutora Andreia Marques Valente e Doutora Marta Sousa Silva, um grande obrigado por toda a ajuda, disponibilidade e compreensão. Agradeço as vossas críticas construtivas e os conhecimentos que me transmitiram neste último ano.

Queria deixar também um agradecimento especial à Mestre Vera Canelas, responsável técnica do laboratório de Química da SGS Portugal, pela oportunidade que me deu em estagiar neste laboratório, pela simpatia com que me acolheu e pelos conhecimentos que me passou.

Não posso deixar de agradecer à Mestre Ana Rita Marques, técnica do laboratório dos Massas da SGS Portugal, por ter acompanhado todo o meu percurso do estágio e da realização da dissertação, sempre com muita paciência e pronta a ajudar no que fosse necessário.

Um grande obrigado também a toda a equipa do laboratório dos Massas da SGS Portugal. Ao João e ao Alexandre pelos bons colegas que têm sido, por todo o apoio e por se demonstrarem sempre disponíveis para me ajudar durante o estágio. À Mariana, um obrigado muito especial, por todos os conhecimentos que me passou, pela paciência que teve para todas as minhas dúvidas e, principalmente, pela amiga que demonstrou ser.

Por último, não podia deixar de agradecer às pessoas que permitem que os meus sonhos e objetivos se realizem: os meus pais, a minha irmã e o meu namorado. Obrigado por todo o apoio e incentivo que me deram e por estarem sempre presentes nos bons e nos maus momentos, sem vocês nada disto seria possível.

Um obrigado do coração a todos vós!

RESUMO

Os frutos secos são alimentos com elevado valor nutricional e importantes para uma alimentação saudável, devido à presença de ácidos gordos e antioxidantes na sua composição. O crescimento do setor agrícola e o aumento das exigências alimentares, têm levado a uma maior aplicação de pesticidas nas produções agrícolas. Os resíduos de pesticidas presentes nos alimentos constituem uma ameaça para a saúde pública, portanto, é importante desenvolver métodos de análise de resíduos de pesticidas em produtos alimentares que garantam o cumprimento dos limites máximos de resíduos estipulados pela União Europeia. Assim, foi desenvolvido e otimizado um método multiresíduo para a análise de pesticidas em matrizes com elevado teor em gordura por cromatografia gasosa acoplada a um espectrómetro de massa quadrupolo triplo (GC-MS/MS). A otimização do processo de extração do método QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) permitiu ultrapassar os problemas associados à complexidade das matrizes com elevado teor de gordura, através de uma etapa de limpeza em fase sólida dispersiva (d-SPE). O método foi validado para os pesticidas clorfenvinfos e malatião e para as matrizes amêndoa e amendoim, seguindo as diretrizes do guia SANTE/11312/2021. O método apresenta uma boa linearidade ($R^2 > 0,995$), dentro da gama de trabalho de 5 a 100 ppb, e demonstra ser específico e seletivo na deteção do clorfenvinfos e do malatião para ambas as matrizes em estudo. O limite de deteção (LD) do método é de 0,004 mg/kg e o limite de quantificação (LQ) corresponde a 0,01 mg/kg. As matrizes avaliadas apresentam boas taxas de recuperação no intervalo de 70 a 120%. O coeficiente de variação (CV) varia entre 3,50% e 10,85% para a repetibilidade e entre 9,07% e 11,28% para a precisão intermédia. A incerteza do método é inferior a 50%. Os resultados da validação encontram-se dentro dos critérios do SANTE/11312/2021 e o método pode ser aplicado a análises de rotina, pois permite quantificar os pesticidas a valores inferiores ao LQ com boas taxas de recuperação.

Palavras-chave: Clorfenvinfos, Malatião, GC-MS/MS, Validação de Métodos, QuEChERS

ABSTRACT

Dried fruits are foods with high nutritional value and are important for a healthy diet, due to the presence of fatty acids and antioxidants in their composition. The growth of the agricultural sector and the increase in food needs led to a greater application of pesticides in agricultural production. Pesticide residues present a threat to public health in specific foods, therefore, it is important to develop methods for analyzing pesticide residues in food products that guarantee compliance with the maximum residue limits stipulated by the European Union. Thus, a multiresidue method was developed and optimized for the analysis of pesticides in high oil matrices via gas chromatography coupled to a triple quadrupole mass spectrometer (GC-MS/MS). The optimization of the QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) extraction method prevented possible problems associated with the complexity of high oil content matrices, through a dispersive solid-phase cleaning step (d-SPE). The method was validated for the pesticides chlorfenvinphos and malathion and for almond and peanut matrices, following the guidelines of the SANTE/11312/2021 guide. The method has good linearity ($R^2 > 0.995$), within the working range of 5 to 100 ppb and has proven to be specific and selective in the detection of chlorfenvinphos and malathion for both matrices under study. The detection limit (LD) of the method is 0.004 mg/kg and the limit of quantification (LQ) corresponds to 0.01 mg/kg. The evaluated matrices present good recovery rates in the range of 70 to 120%. The coefficient of variation (CV) varies between 3.50% and 10.85% for repeatability and between 9.07% and 11.28% for intermediate precision. The uncertainty of the method is less than 50%. The validation results meet the SANTE/11312/2021 criteria and the method can be applied to routine analyses, as it allows pesticides to be quantified at values below the LQ with good recovery rates.

Keywords: Chlorfenvinphos, Malathion, GC-MS/MS, Method Validation, QuEChERS

ÍNDICE

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	1
1.1. A empresa SGS	1
1.1.1. SGS Global	1
1.1.2. SGS Portugal	1
1.2. Desenvolvimento do setor agrícola, aplicação de pesticidas e impactos associados	3
1.3. Pesticidas	5
1.3.1. História dos pesticidas	5
1.3.2. Química dos pesticidas	5
1.3.3. Pesticidas organofosfatos	6
1.3.4. Pesticidas Organoclorados	7
1.4. Malatião	8
1.5. Clorfenvinfos	10
1.6. Métodos de extração de resíduos de pesticidas	11
1.7. Método QuEChERS	12
1.7.1. Solvente de extração	13
1.7.2. Salting-out	13
1.7.3. Limpeza d-SPE	14
1.8. Separação e deteção de resíduos de pesticidas	15
1.9. GC-MS/MS	16
1.9.1. Separação por cromatografia gasosa	16
1.9.2. Ionização de eletrões	17
1.9.3. Separação de massa	18
1.10. Validação do método de análise	19
1.10.1. Especificidade e Seletividade	19
1.10.2. Linearidade e Gama de trabalho	20
Gama de Trabalho	20
Linearidade	21
1.10.3. Limiares analíticos	21
1.10.4. Precisão	22
Repetibilidade	22
Precisão Intermédia	23
1.10.5. Exatidão	23
1.10.6. Incerteza	24
Incerteza de precisão	24
Incerteza de veracidade	24
Incerteza combinada	25
Incerteza expandida	25
CAPÍTULO II – PARTE EXPERIMENTAL	26
2.1. Material e Reagentes	26

Material e equipamento	26
Amostras e reagentes	26
Preparação da solução padrão A	26
Preparação da solução padrão B	27
2.2. Procedimento Experimental	28
Extração de pesticidas	28
Ensaio de recuperação	28
Reta de calibração	28
Condições cromatográficas	29
Validação	29
CAPÍTULO III – RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
3.1. Otimização do processo de extração	31
3.2. Validação	36
3.2.1. Gama de Trabalho	36
3.2.2. Linearidade	37
3.2.3. Especificidade e Seletividade	40
3.2.4. Limiares Analíticos	41
3.2.5. Precisão	42
Repetibilidade	42
Precisão Intermédia	44
3.2.6. Exatidão	46
3.2.7. Controlo de Duplicados	50
3.2.8. Incerteza	52
3.3. Aplicação à Análise de Rotina	53
3.4. Perspetivas futuras	55
CAPÍTULO IV - CONCLUSÃO	56
BIBLIOGRAFIA	57
APÊNDICE A	63
Soluções padrão de mistura de pesticidas	63
APÊNDICE B	65
Teste da homogeneidade de variâncias	65
Teste de Mandel	69
Limite de quantificação – Ensaio de recuperação	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Logotipo da empresa SGS.	1
Figura 2 - Estrutura química geral do grupo fosfato (a) e fosforotioato (b). R ¹ e R ² representam geralmente grupos alquilos ou arílicos que podem estar ligados diretamente ou através de átomos de oxigênio ou de enxofre. X pode representar grupos alifáticos, aromáticos ou heterocíclicos substituídos ou ramificados ligados ao átomo de fósforo.	6
Figura 3 – Estrutura química do malatião(a), malaxão (b) e isomalatião (c).	9
Figura 4 - Procedimento QuEChERS para a extração de pesticidas.	12
Figura 5 – Técnicas analíticas disponíveis para a análise de pesticidas em matrizes alimentares.	15
Figura 6 - GC-MS/MS, modelo EVOQ GC-TQ (imagem retirada do site do fabricante, https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/mass-spectrometry/triple-quads.html).	16
Figura 7 - Composição da coluna Rxi®-5Sil MS.	17
Figura 8 - Esquema relativo ao método de ionização de elétrons e ao sistema quadrupolo (imagem retirada de Wittmann 2007).	18
Figura 9 - Esquema relativo a um quadrupolo triplo (imagem retirada de Agilent 7000/7010 Series Triple Quadrupole GC/MS System Concepts Guide).	18
Figura 10 - Representação gráfica dos cromatogramas obtidos por GC-MS/MS da análise do clorfenvinfos extraído da amêndoa, com a adição de ácido acético (A e B) e sem a adição de ácido acético (C e D). A e C representam os picos dos íons quantificadores e B e D representam os picos referentes aos íons qualificadores.	34
Figura 11 - Representação gráfica dos cromatogramas obtidos por GC-MS/MS da análise do malatião extraído da amêndoa, com a adição de ácido acético (A, B e C) e sem a adição de ácido acético (D, E e F). A e D representam os picos dos íons quantificadores e B, C, E e F representam os picos referentes aos íons qualificadores.	34
Figura 12 - Representação gráfica da reta de calibração obtida para o clorfenvinfos na amêndoa (A) e no amendoim (B).	37
Figura 13 - Representação gráfica da reta de calibração obtida para o malatião na amêndoa (A) e no amendoim (B).	38
Figura 14 - Representação gráfica dos cromatogramas obtidos por GC-MS/MS para o padrão 6 na análise do clorfenvinfos extraído da amêndoa (A e B) e do amendoim (C e D). A e C representam os picos dos íons quantificadores e B e D representam os picos referentes aos íons qualificadores.	40
Figura 15 - Representação gráfica dos cromatogramas obtidos por GC-MS/MS para o padrão 6 na análise do clorfenvinfos extraído da amêndoa (A, B e C) e do amendoim (D, E e F). A e D representam os picos dos íons quantificadores e B, C, E e F representam os picos referentes aos íons qualificadores.	41

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Nome IUPAC, fórmula molecular, estrutura molecular, massa molar e perigos associados ao malatião.	8
Tabela 2 - Nome IUPAC, fórmula molecular, estrutura molecular, massa molar e perigos associados ao clorfenvinfos.	10
Tabela 3 - Preparação das soluções para a reta de calibração a partir da solução A, da solução B e do extrato de matriz.	29
Tabela 4 - Condições cromatográficas estabelecidas no GC para a validação do método.	29
Tabela 5 - Parâmetros utilizados na validação do método e critérios de avaliação e de aceitação de cada parâmetro.	30
Tabela 6 - Resumo das adaptações ao método QuEChERS consultadas na bibliografia.	32
Tabela 7 - Resultados obtidos para o teste da homogeneidade de variâncias.	37
Tabela 8 - Resultados da equação da reta e do coeficiente de correlação obtidos para as retas de calibração.	38
Tabela 9 - Resultados obtidos para a realização do teste de <i>Mandel</i> .	38
Tabela 10 - Resultados obtidos para a análise de resíduos da reta de calibração para o clorfenvinfos na amêndoa.	39
Tabela 11 - Resultados obtidos para a análise de resíduos da reta de calibração para o clorfenvinfos no amendoim.	39
Tabela 12 - Resultados obtidos para a análise de resíduos da reta de calibração para o malatião na amêndoa.	39
Tabela 13 - Resultados obtidos para a análise de resíduos da reta de calibração para o malatião no amendoim.	40
Tabela 14 - Resultados obtidos dos tempos de retenção e razões iônicas para os padrões e para a amostra fortificada.	41
Tabela 15 - Valores de LD e de LQ obtidos na validação do método.	42
Tabela 16 - Valores médios de concentração obtidos para amostras fortificadas e respectivas recuperações.	42
Tabela 17 - Resultados obtidos para a repetibilidade na validação do clorfenvinfos na amêndoa.	43
Tabela 18 - Resultados obtidos para a repetibilidade na validação do clorfenvinfos no amendoim.	43
Tabela 19 - Resultados obtidos para a repetibilidade na validação do malatião na amêndoa.	44
Tabela 20 - Resultados obtidos para a repetibilidade na validação do malatião no amendoim.	44
Tabela 21 - Resultados obtidos para a precisão intermédia na validação do clorfenvinfos na amêndoa.	45

Tabela 22 - Resultados obtidos para a precisão intermédia na validação do clorfenvinfos no amendoim.	45
Tabela 23 - Resultados obtidos para a precisão intermédia na validação do malatião na amêndoa.	45
Tabela 24 - Resultados obtidos para a precisão intermédia na validação do malatião no amendoim.	46
Tabela 25 - Resultados obtidos para avaliar a exatidão na validação do clorfenvinfos na amêndoa.	47
Tabela 26 - Resultados obtidos para avaliar a exatidão na validação do clorfenvinfos no amendoim.	48
Tabela 27 - Resultados obtidos para avaliar a exatidão na validação do malatião na amêndoa.	49
Tabela 28 - Resultados obtidos para avaliar a exatidão na validação do malatião no amendoim.	50
Tabela 29 - Resultados obtidos para a análise de duplicados na validação do clorfenvinfos na amêndoa.	51
Tabela 30 - Resultados obtidos para a análise de duplicados na validação do clorfenvinfos no amendoim.	51
Tabela 31 - Resultados obtidos para a análise de duplicados na validação do malatião na amêndoa.	51
Tabela 32 - Resultados obtidos para a análise de duplicados na validação do malatião no amendoim.	51
Tabela 33 - Valores obtidos para a estimativa da incerteza do método.	52
Tabela 34 - Equações das retas de calibração e coeficientes de correlação obtidos para a análise de amostras de rotina.	53
Tabela 35 - Resultados de concentração de clorfenvinfos obtidos na análise de amostras de rotina.	54
Tabela 36 - Resultados de concentração de malatião obtidos na análise de amostras de rotina.	54
Tabela A 1 - Soluções de mistura de pesticidas Restek utilizadas neste trabalho.	63
Tabela A 2 - Resultados obtidos no teste da homogeneidade de variâncias para a validação do clorfenvinfos na amêndoa.	65
Tabela A 3 - Resultados obtidos no teste da homogeneidade de variâncias para a validação do clorfenvinfos no amendoim.	66
Tabela A 4 - Resultados obtidos no teste da homogeneidade de variâncias para a validação do malatião na amêndoa.	67
Tabela A 5 - Resultados obtidos no teste da homogeneidade de variâncias para a validação do malatião no amendoim.	68
Tabela A 6 - Resultados obtidos no teste de Mandel para a validação do clorfenvinfos na amêndoa.	69
Tabela A 7 - Resultados obtidos no teste de Mandel para a validação do clorfenvinfos no amendoim.	69
Tabela A 8 - Resultados obtidos no teste de Mandel para a validação do malatião na amêndoa.	70
Tabela A 9 - Resultados obtidos no teste de Mandel para a validação do malatião no amendoim.	70

Tabela A 10 - Resultados obtidos nos ensaios de recuperação para a determinação do LQ na validação do clorfenvinfos na amêndoa.	71
Tabela A 11 - Resultados obtidos nos ensaios de recuperação para a determinação do LQ na validação do clorfenvinfos no amendoim.	72
Tabela A 12 - Resultados obtidos nos ensaios de recuperação para a determinação do LQ na validação do malatião na amêndoa.	72
Tabela A 13 - Resultados obtidos nos ensaios de recuperação para a determinação do LQ na validação do malatião no amendoim.	73

SIGLAS E ABREVIATURAS

AChE	Acetilcolinesterase
ACN	Acetonitrilo
APCI	Ionização química à pressão atmosférica
CI	Ionização química
CH₃CN	Acetonitrilo
C₆H₅CH₃	Tolueno
C₁₈	Octadecilsilano
CV	Coefficiente de variação
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva
d-SPE	Extração em fase sólida dispersiva
EI	Ionização de elétrons
ESI	Ionização por eletrospray
GC	Cromatografia gasosa
GCB	Carbono negro grafitado
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
GC-MS/MS	Cromatografia gasosa acoplada a um espectrómetro de massa quadrupolo triplo
HCB	Hexaclorobenzeno
HCH	Hexaclorociclohexano
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
H₂O	Água
LC	Cromatografia líquida
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada a um espectrómetro de massa quadrupolo triplo
LD	Limite de detecção
LiCl	Cloreto de lítio
LLE	Extração líquido-líquido
LLME	Microextração líquido-líquido
LMR	Limite máximo de resíduos de pesticidas

LQ	Limite de quantificação
MgCl₂	Cloreto de magnésio
MgSO₄	Sulfato de magnésio
MRM	Monitorização de reação múltipla
MS	Espetrómetros de massa
MSPD	Dispersão em fase sólida da matriz
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
NaCl	Cloreto de sódio
NaNO₃	Nitrato de sódio
Na₂SO₄	Sulfato de sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
POP	Poluentes orgânicos persistentes
PSA	N-propiletlenodiamina
QuEChERS	<i>Quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe</i>
r	Limite de repetibilidade
R²	Coefficiente de correlação
RCF	<i>Relative centrifugal force</i>
RI	Razão iónica
SGS	<i>Société Générale de Surveillance</i>
SIM	Monitorização de iões seletivos
SPE	Extração em fase sólida
SPME	Microextração em fase sólida
SRM	Monitorização de reação única
TOF	Tempo-de-voo
TR	Tempo de retenção
U	Incerteza expandida
<i>u</i>_{combinada}	Incerteza combinada
<i>u</i>_{precisão}	Incerteza de precisão
<i>u</i>_{veracidade}	Incerteza de veracidade
UHPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

1.1. A EMPRESA SGS

SGS Global

A SGS (*Société Générale de Surveillance*) é uma empresa multinacional líder mundial em testes, inspeção e certificação e conhecida como uma referência global em sustentabilidade, qualidade e integridade. (“SGS, About SGS” 2023)

A história da SGS tem início em 1878, em França, quando um jovem empreendedor, Henri Goldstuck, decide inspecionar os carregamentos de grão importado num porto de Rouen, de forma a proteger os direitos dos exportadores. Rapidamente o negócio de inspeção de grão cresce e a empresa passa a oferecer serviços inovadores de inspeção agrícola (“SGS, Our History” 2023).

Em 1919 a empresa é registada em Genebra, na Suíça, como *Société Générale de Surveillance*. Em 1928 a empresa cresceu internacionalmente com escritórios e laboratórios em várias partes do mundo para inspeção e análise de matérias primas, minerais e metais. Mais tarde, a SGS adquire também o negócio de petróleo, gás e serviços químicos (“SGS, Our History” 2023).

Atualmente, a SGS atua numa ampla variedade de setores industriais, empregando mais de 97000 colaboradores em 2650 escritórios e laboratórios em quase todos os países do mundo (“SGS, Our History” 2023). A figura 1 apresenta o logotipo da empresa SGS.



Figura 1 - Logotipo da empresa SGS.

SGS Portugal

A SGS Portugal foi fundada em 1922 pelo Grupo SGS, com o objetivo de desenvolver a sua atividade seguindo os mesmos princípios de ação do próprio grupo (“SGS Portugal, Sobre a SGS” 2023).

Presentemente a SGS Portugal emprega mais de 300 colaboradores diretos e conta com uma extensa bolsa de especialistas externos com total cobertura geográfica nacional (“SGS Portugal, Sobre a SGS” 2023).

A atividade da SGS Portugal iniciou-se com o controlo de operações de carga e descarga de cereais a granel. Atualmente, esta empresa oferece serviços nas áreas da inspeção, verificação, ensaios e testes laboratoriais, consultoria e certificação em diversos setores. Em Portugal a empresa possui

laboratórios acreditados nas áreas alimentar, agrícola, mineral, ambiental, cosmética, dispositivos médicos e produtos químicos e petrolíferos (“SGS Portugal, Sobre a SGS” 2023).

Mais especificamente no setor da agricultura e alimentação, a SGS Portugal assegura a segurança, qualidade e sustentabilidade de alimentos, de forma a proteger o consumidor e a garantir um negócio sustentável. Desta forma, a SGS Portugal proporciona diversos testes de deteção de contaminantes em alimentos, no qual se inserem os testes de resíduos de pesticidas. Os laboratórios da SGS Portugal estão preparados para testar uma ampla gama de resíduos de pesticidas em alimentos, usando técnicas de cromatografia líquida e cromatografia gasosa, de forma a garantir que os clientes cumpram todas as normas regulamentares estabelecidas no país (“SGS Portugal, Agricultura & Alimentação” 2023).

1.2. DESENVOLVIMENTO DO SETOR AGRÍCOLA, APLICAÇÃO DE PESTICIDAS E IMPACTOS ASSOCIADOS

O aumento da população e a melhoria da qualidade de vida levam à procura de um maior número de bens alimentares e com melhor qualidade. A agricultura é um dos principais setores na maioria dos países devido aos seus impactos económicos e às necessidades populacionais (Lawal et al. 2018). Com o crescimento populacional exponencial é de esperar que nos próximos anos o setor agrícola enfrente largos desafios para salvaguardar a produção de alimentos. Mais concretamente, espera-se que, na próxima década, a indústria alimentar aumente 15% da sua produção para atender às necessidades nutricionais da população crescente, enquanto que até 2050 é estimado um aumento de 50% (Lykogianni et al. 2021).

O crescimento do setor agrícola, por sua vez, acarreta uma maior necessidade de proteger as produções de organismos prejudiciais, a fim de evitar perdas de rendimento ou danos às plantas e aos produtos vegetais e também de assegurar a qualidade dos produtos colhidos e garantir uma boa produtividade agrícola (Cee 2005). É neste contexto que surgem os pesticidas. De acordo com a Comissão Europeia, um pesticida é definido como algo que previne, destrói ou controla um organismo prejudicial (praga) ou doença, ou protege plantas ou produtos vegetais durante a produção, armazenamento e transporte (“European Commission” 2022). Os pesticidas incluem, entre outros: herbicidas, fungicidas, inseticidas, acaricidas, nematocidas, moluscicidas, reguladores de crescimento, repelentes, raticidas e biocidas (Alasalvar et al. 2021).

Anualmente têm ocorrido perdas de rendimento entre 20 e 40% da produção agrícola global causadas por pragas e patogénicos e, com as mudanças climáticas, esses valores tendem a aumentar. Posteriormente, isso resulta num aumento das aplicações dos pesticidas, (Lykogianni et al. 2021) como se tem já vindo a verificar: o uso global de pesticidas nos últimos 30 anos tem vindo a aumentar, com aproximadamente 3 milhões de toneladas de compostos ativos constantemente aplicados anualmente (“Food and Agriculture Organization of the United Nations” 2022). No entanto, o uso excessivo de produtos agrotóxicos, combinado com a falta de aplicação de boas práticas agrícolas, pode provocar efeitos desfavoráveis no meio ambiente e na saúde humana (Alcântara et al. 2019).

No setor agrícola, o uso excessivo de pesticidas tem exibido vários problemas de saúde pública, contribuindo também para um impacto ambiental negativo (Kumar et al. 2011). A exposição a diferentes tipos de pesticidas pode aumentar os riscos de doenças crónicas, como diabetes, cancro e doenças neurodegenerativas, mas também pode aumentar o risco de fertilidade reduzida e anomalias congénitas. Os níveis de exposição a estes compostos, mesmo que seja a concentrações muito baixas, podem ter efeitos biológicos mensuráveis (Fucic et al. 2021).

Uma consequência do aumento do uso de pesticidas pode ser a presença de resíduos nos produtos tratados, e, face aos danos prejudiciais à saúde humana referidos anteriormente, é importante implementar medidas de segurança alimentar para garantir que os alimentos comercializados são seguros para os consumidores, por exemplo, impondo limites máximos de resíduos de pesticidas (LMR) (Burki 2022). A nível internacional, a Organização Mundial da Saúde (OMS) tem um programa que promove e coordena políticas, estratégias e diretrizes para o uso de pesticidas na saúde pública (Jaga and Dharmani 2003). Outras organizações, como a Organização da Alimentação e da Agricultura dos Estados Unidos, a Organização das Nações Unidas e a Comissão Europeia são responsáveis por estabelecer os LMR em alimentos para vários pesticidas (Su et al. 2011). Assim, os LMR são estabelecidos para cada pesticida, ao nível mais baixo coerente com as boas práticas agrícolas, de forma

a assegurar que esses resíduos não estão presentes em níveis que representem um risco para a saúde humana (Cee 2005).

Assim como os legumes e os frutos frescos, os frutos secos também podem conter resíduos de pesticidas e, portanto, devem ser desenvolvidas análises adequadas para garantir consumo seguro dos mesmos (Varela-Martínez et al. 2019).

Os frutos secos são alimentos ricos em nutrientes e permitem o fornecimento de compostos bioativos ao nosso organismo, beneficiando assim a nossa saúde (Mahdavi et al. 2020). São, portanto, alimentos importantes para a nutrição diária humana e requerem igual preocupação de análise de resíduos face aos frutos frescos.

1.3. PESTICIDAS

História dos pesticidas

O uso de pesticidas começou há cerca de 4500 anos, com o recurso a enxofre elementar para remoção de pragas. Centenas de anos depois, os chineses recorriam a compostos de mercúrio e arsénio para eliminar piolhos. Estes compostos, assim como também substâncias inorgânicas e orgânicas naturais, foram utilizados até começarem a surgir os primeiros pesticidas sintéticos na década de 1940 (“Agrochemicals IUPAC” 2023).

O crescimento dos pesticidas sintéticos acelerou com a descoberta do diclorodifeniltricloroetano (DDT), hexaclorobenzeno (HCB), aldrina, dieldrina, endrina e clordano (“Agrochemicals IUPAC” 2023). No entanto, o uso destes pesticidas não é autorizado pelas Nações Unidas desde 1973, quando foi acordada a eliminação dos poluentes orgânicos persistentes (POP) (“ASAE” 2023).

Na década de 1940, os pesticidas sintéticos eram maioritariamente utilizados para a destruição de reservas alimentares na Segunda Guerra Mundial e, posteriormente, ganharam maior utilidade no controlo de processos de cultivo de alimentos consumidos diariamente (Abubakar et al. 2019).

O período entre 1940 e 1960 ficou marcado pelo sucesso de inseticidas organoclorados e organofosfatos. Só depois é que surgiu a era do terceiro grupo de pesticidas denominados carbamatos (Kaushik et al. 2007).

Vários cientistas foram destacando os efeitos adversos dos agrotóxicos na saúde humana, no entanto, só na década de 1960 é que começou a surgir a necessidade de desenvolver produtos mais seguros e ecologicamente corretos. Em 1962, o sucesso do livro “Silent Spring” de Rachel Carson, que relatava os efeitos nocivos associados ao DDT, levou à proibição do uso deste pesticida nos Estados Unidos e na maioria dos países desenvolvidos, e à sua substituição por organofosfatos e carbamatos de menor risco. No entanto, ainda existem países em desenvolvimento onde a produção e o uso do DDT são permitidos (Abubakar et al. 2019).

Após uma pesquisa contínua por novos pesticidas, nas décadas de 1970 e 1980 foi introduzido o herbicida mais vendido no mundo, o glifosato. Nesta época também foram desenvolvidas novas gerações de inseticidas e introduzidas novas famílias de fungicidas (“Agrochemicals IUPAC” 2023).

Na década da 1990, as pesquisas centraram-se no desenvolvimento de novos pesticidas, de famílias já existentes, que apresentassem maior seletividade e tivessem menos riscos ambientais e toxicológicos associados (“Agrochemicals IUPAC” 2023).

Química dos pesticidas

Os pesticidas são classificados de acordo com a classe química a que pertencem, os grupos funcionais presentes, modos de ação e toxicidade. Primeiro são classificados tendo em conta as diferentes pragas que vão eliminar, podendo corresponder a herbicidas, fungicidas, inseticidas, raticidas, entre outros. No que diz respeito às classes químicas, os pesticidas são classificados como orgânicos ou inorgânicos. Os pesticidas inorgânicos incluem na sua composição sulfato de cobre, sulfato de ferro (II), cobre, óxido de cálcio ou enxofre. Quanto aos pesticidas orgânicos, a sua classificação é mais complexa,

sendo estes classificados de acordo com a sua estrutura química e grupos funcionais. Os pesticidas orgânicos incluem inseticidas organoclorados, inseticidas organofosfatos, inseticidas carbamatos, inseticidas piretroides sintéticos, herbicidas metabólicos e análogos de hormonas, herbicidas sintéticos de ureia, herbicidas triazina, nematocidas benzimidazólicos, moluscicidas de metaldeído, rodenticidas de fosfato de metal e rodenticidas à base de vitaminas do grupo D (Tudi et al. 2021).

Os pesticidas escolhidos para validação neste trabalho, o malatião e o clorfenvinfos, pertencem ao grupo dos pesticidas organofosfatos, apesar do clorfenvinfos também ser considerado um pesticida organoclorado.

Pesticidas organofosfatos

Os organofosfatos são um grupo amplo de pesticidas utilizados no domínio da agricultura desde 1960, e atualmente representam cerca de 40% do mercado global de pesticidas (Kaushal et al. 2021). Este grupo pertence à classe dos inseticidas, uma vez que são destinados a eliminar insetos como pulgas, piolhos, moscas e mosquitos (Jaga et al. 2003). Nos últimos anos, este tipo de pesticidas tem vindo a ganhar maior utilidade como alternativa aos pesticidas organoclorados, uma vez que se degradam com maior facilidade no meio ambiente, apresentam um menor impacto ambiental, são mais seguros e menos persistentes (Sidhu et al. 2019).

No entanto, a exposição aguda ou crónica aos organofosfatos também pode ser tóxica para os humanos, animais, plantas e insetos. Estes compostos inibem a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), não apenas em insetos, mas também em organismos aquáticos e terrestres, podendo provocar anomalias respiratórias, reprodutivas, nervosas, hepáticas e renais (Sidhu et al. 2019).

O termo organofosfato é usado para descrever todos os compostos químicos nos quais um grupo fosfato, ou derivado de fosfato, pertence a uma molécula orgânica. Geralmente são ésteres, amidas ou derivados tiólicos de ácido fosfórico e a respetiva estrutura geral encontra-se representada na figura 2 para fosfatos (a) ou fosfortiatiatos (b) (Committee on Toxicity of Chemicals in Food 1999).



Figura 2 - Estrutura química geral do grupo fosfato (a) e fosfortiatio (b). R¹ e R² representam geralmente grupos alquilos ou arilos que podem estar ligados diretamente ou através de átomos de oxigénio ou de enxofre. X pode representar grupos alifáticos, aromáticos ou heterocíclicos substituídos ou ramificados ligados ao átomo de fósforo.

As propriedades físico-químicas destes compostos organofosfatos, como a volatilidade e a lipofilicidade, dependem das estruturas dos seus substituintes. Geralmente, os compostos organofosfatos que são usados como inseticidas são menos voláteis que os organoclorados, frequentemente sólidos à temperatura ambiente e mais estáveis em solução aquosa (Committee on Toxicity of Chemicals in Food 1999).

No que diz respeito à detecção de resíduos de pesticidas organofosfatos em alimentos, a cromatografia líquida (LC) e a cromatografia gasosa (GC) têm sido amplamente utilizadas nos últimos anos. Dado que a maioria dos organofosfatos são termicamente estáveis e voláteis, a análise por GC é a mais adequada (Alcântara et al. 2019).

Pesticidas Organoclorados

Os organoclorados são um grupo de compostos clorados amplamente utilizados como pesticidas sintéticos. São conhecidos pela elevada toxicidade contra organismos-alvo, o que lhes permite uma grande eficácia como pesticidas (Kaushik et al. 2007).

Quanto às propriedades físico-químicas, os compostos organoclorados apresentam baixa polaridade, baixa solubilidade aquosa e elevada lipofilicidade (Jayaraj et al. 2016).

Em relação à estrutura química, os organoclorados são compostos orgânicos que contêm átomos de cloro ligados à estrutura de carbono através de ligações covalentes. Podem apresentar diversas estruturas, apesar de, na sua maioria, serem compostos sintéticos que possuem cadeias alifáticas e anéis aromáticos (Shukla et al. 2014).

O modo de ação dos inseticidas organoclorados baseia-se na sua atividade no sistema nervoso, nos axónios, em que interrompem o movimento de iões, como o sódio, para o exterior e interior das células nervosas dos insetos (Tsai 2014).

Os inseticidas organoclorados como o DDT, hexaclorociclohexano (HCH), aldrina e dieldrina estão entre os pesticidas mais amplamente utilizados nos países em desenvolvimento da Ásia (Jayaraj et al. 2016). No entanto, devido à sua elevada persistência no meio ambiente, difícil degradação e bioacumulação, estes compostos pertencem ao grupo dos POP (poluentes orgânicos persistentes) e a sua utilização não é permitida nos países desenvolvidos (“FAO” 2023).

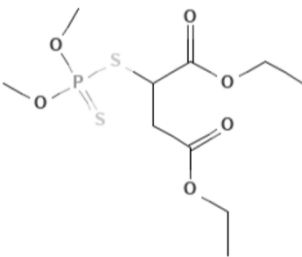

Para separação e detecção de resíduos de pesticidas organoclorados em alimentos, a técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) é a mais adequada. Foram desenvolvidos vários estudos sobre a análise de pesticidas que demonstram que a sensibilidade de GC-MS para a maioria dos organoclorados é maior do que a de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS), (revisto em Alcântara et al. 2019).

1.4. MALATIÃO

O malatião foi introduzido pela primeira vez em 1950 pela *American Cyanamid Company* (Flessel et al. 1993). É um inseticida sintético, que pertence ao grupo dos pesticidas organofosfatos, e tem aplicações em ambientes de saúde pública, residenciais e agrícolas para controlar a população de pragas e doenças. Mais especificamente, é adequado para o controlo de insetos em frutas e vegetais, insetos domésticos, parasitas de animais e piolhos. Este pesticida também tem aplicações na área da medicina veterinária, uma vez que atua como agente anti-infeccioso, permitindo controlar doenças transmitidas por insetos, como a malária, dengue e febre amarela (Singh et al. 2014).

Na tabela 1 encontra-se informação química referente ao malatião (“PubChem” 2022a).

Tabela 1 - Nome IUPAC, fórmula molecular, estrutura molecular, massa molar e perigos associados ao malatião.

Malatião	
Nome IUPAC	dietil 2-dimetoxifosfinotiolsulfanilbutanodioato
Fórmula molecular	$C_{10}H_{19}O_6PS_2$
Estrutura molecular	
Massa molar	330,4 g.mol ⁻¹
Perigos	 Perigo para a saúde e Perigo para o meio ambiente

Quanto ao modo de ação, este pesticida inativa irreversivelmente a enzima AChE (acetilcolinesterase) que decompõe a acetilcolina. Para provocar a morte dos insetos, o malatião atua no sistema nervoso dos mesmos, inibindo a atividade da AChE, o que leva à acumulação da acetilcolina nas sinapses colinérgicas, aumentando a estimulação dos recetores colinérgicos e prolongando o potencial de ação nos nervos, causando assim, a morte dos insetos (“NCIthesaurus” 2022; Singh et al. 2014).

No que diz respeito à toxicidade, o malatião é amplamente utilizado por apresentar uma toxicidade aguda relativamente baixa em comparação com outros inseticidas organofosfatos (Flessel et al. 1993). No entanto, está provado que a exposição a este inseticida produz efeitos tóxicos em humanos e outros mamíferos (Singh et al. 2014).

O malatião pode ocorrer em duas formas, na forma pura, que é conhecida como um líquido incolor, ou em solução de grau técnico, um líquido amarelo-acastanhado, que geralmente é utilizado para aplicações agrícolas (Singh et al. 2014). O malaxão e o isomalatião (Figura 3) são impurezas significativas presentes no malatião de grau técnico e são consideradas mais tóxicas do que o próprio malatião puro, potencializando assim a toxicidade do malatião de grau técnico (Zhang et al. 2011).

O malatião de grau técnico tem o potencial de produzir efeitos genotóxicos em sistemas de mamíferos, incluindo humanos, podendo causar mutações que levam à perda de genes supressores de tumor, originando cancro. A exposição a este pesticida também pode causar problemas reprodutivos adversos em humanos (Flessel et al. 1993).

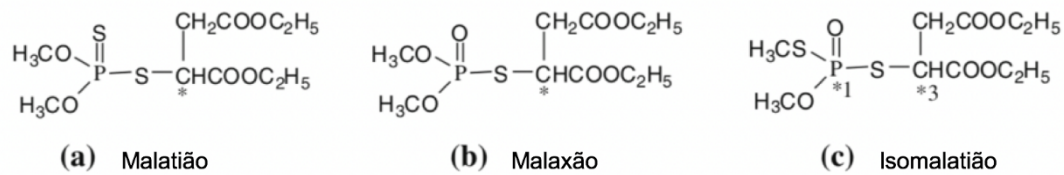


Figura 3 – Estrutura química do malatião(a), malaxão (b) e isomalatião (c).

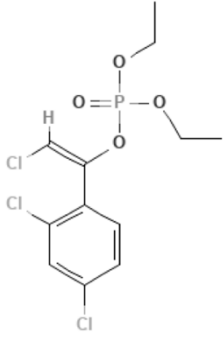

1.5. CLORFENVINFOS

O clorfenvinfos pode ser classificado como um fosfato orgânico, um inseticida organofosfato, um inseticida organoclorado e um diclorobenzeno (“ChEBI” 2023). É usado principalmente como inseticida para controlar pragas, como moscas, pulgas e ácaros (“ATSDR” 2023) e atua como inibidor da AChE no sistema nervoso (“ChEBI” 2023).

O clorfenvinfos é um composto sintético e na sua forma pura ocorre como um líquido incolor com um odor suave. No entanto, as suas formas comerciais apresentam cerca de 90% de pureza e são conhecidas por nomes comerciais comuns, como Birlane, Dermaton, Sapercon, Steladone e Supona (“ATSDR” 2023).

Na tabela 2 encontra-se informação química referente ao clorfenvinfos (“PubChem” 2022b).

Tabela 2 - Nome IUPAC, fórmula molecular, estrutura molecular, massa molar e perigos associados ao clorfenvinfos.

Clorfenvinfos	
Nome IUPAC	[(Z)-2-cloro-1-(2,4-diclorofenil) etenil] dietil fosfate
Fórmula molecular	$C_{12}H_{14}Cl_3O_4P$
Estrutura molecular	
Massa molar	359,6 g.mol ⁻¹
Perigos	 Toxicidade aguda e Perigo para o meio ambiente

Este composto apresenta elevada toxicidade e persistência no meio ambiente e a sua exposição pode afetar o sistema nervoso, causar danos aos olhos, fígado, rins, podendo também causar lesões no sistema cardiovascular e reprodutivo (Oliveira et al. 2014).

1.6. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS

Os resíduos de pesticidas com maior solubilidade, massa molecular, meia-vida e nível de toxicidade com baixa pressão de vapor acumulam-se facilmente nos produtos alimentares e tornam-se persistentes no meio ambiente (Lawal et al. 2018; Narendran et al. 2020), causando impactos ambientais negativos e colocando em risco a saúde dos consumidores. Portanto, a determinação dos limites máximos de resíduos (LMR) de pesticidas tornou-se necessária para garantir a segurança alimentar (Orso et al. 2014).

O desenvolvimento de métodos eficientes de extração e detecção de resíduos de pesticidas é um grande desafio, dada a sua vasta gama de propriedades químicas, como é o caso da acidez, da basicidade e da polaridade. Além disso, as características das matrizes analisadas variam consoante o teor de gordura, o teor de água, a pigmentação, entre outros fatores (Orso et al. 2014). Desta forma, é importante que sejam investigados e desenvolvidos métodos mais eficazes de detecção de multiresíduos de pesticidas em amostras alimentares.

Existem várias técnicas relatadas para a extração de pesticidas em amostras alimentares. Essas técnicas incluem: extração líquido-líquido (*liquid-liquid extraction*, LLE); extração em fase sólida (*solid-phase extraction*, SPE); microextração em fase sólida (*solid-phase microextraction*, SPME); dispersão em fase sólida da matriz (*matrix solid phase dispersion*, MSPD); microextração líquido-líquido dispersiva (*dispersive liquid-liquid microextraction*, DLLME) e microextração líquido-líquido (*liquid-liquid microextraction* LLME), (Narendran et al. 2020). No entanto, estas técnicas apresentam algumas limitações, como tempos de análise elevados, dificuldade operacional, uso de solventes orgânicos tóxicos e com menor seletividade, configurações de extração mais dispendiosas e queda de desempenho em curto espaço de tempo (Lawal et al. 2018), resultando na necessidade de desenvolver técnicas mais eficientes que superem estas desvantagens.

1.7. MÉTODO QUECHERS

Em 2003, Anastassiades e Lehotay introduziram um novo método baseado na extração de pesticidas com acetonitrilo seguida de um procedimento de limpeza que recorre à extração em fase sólida dispersiva (*dispersive solid phase extraction*, d-SPE), (Anastassiades et al. 2003). Este método é denominado por método QuEChERS (*quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe*). Atualmente, o método QuEChERS é o mais utilizado para a preparação de amostras de frutas e vegetais, tendo em conta que se trata de uma técnica mais simples, com excelentes capacidades de recuperação, com elevada seletividade no analito de interesse e que consome menos tempo e solventes orgânicos face aos métodos desenvolvidos anteriormente (Tankiewicz and Berg 2022; Narendran et al. 2020).

O procedimento de extração QuEChERS, representado esquematicamente na Figura 4, consiste em duas etapas principais: 1. a extração/ partição sólido-líquido com efeito *salting out*, no qual os analitos são extraídos da matriz com um solvente de extração (normalmente, com acetonitrilo e sais); e 2. a etapa de limpeza através da extração d-SPE para eliminar interferências do extrato, na qual se pode usar adsorventes como uma amina primária secundária: o N-propil-etilenodiamina (PSA); octadecilsilano (C_{18}) e carbono negro grafitado (GCB), (“Sigma Aldrich” 2023).

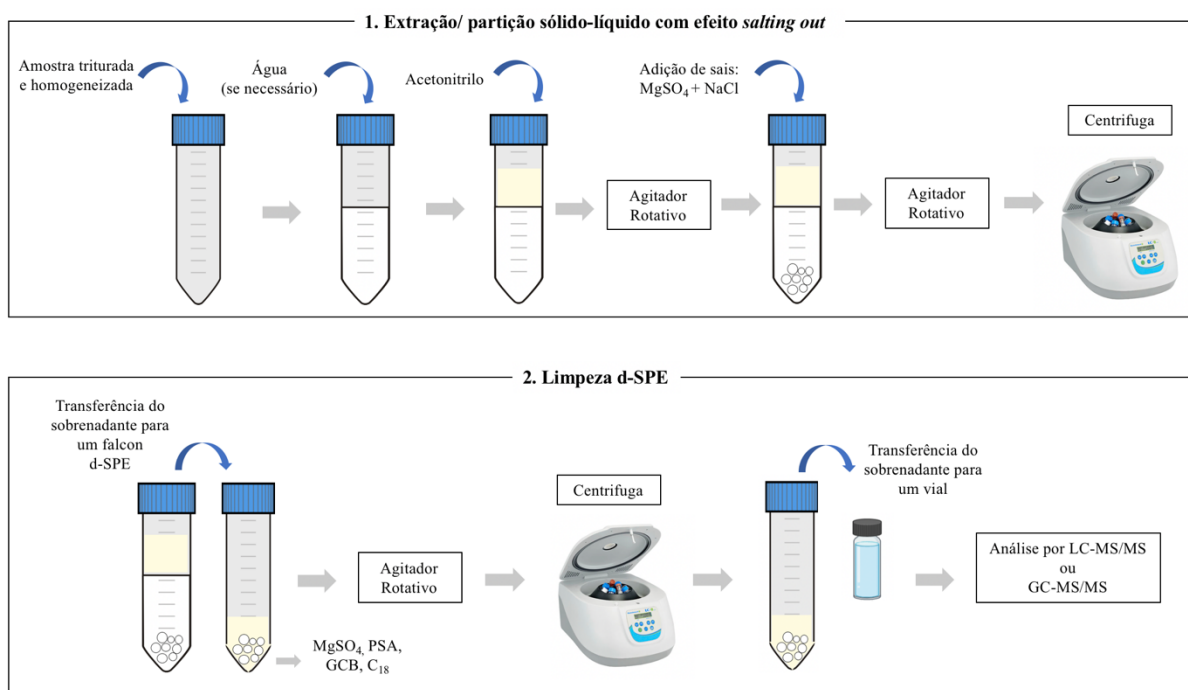


Figura 4 - Procedimento QuEChERS para a extração de pesticidas.

Existem diversos fatores que podem afetar a eficiência da extração no método QuEChERS, como o tamanho da amostra, pH, composição da matriz, tipo de solvente usado, relação amostra/solvente, modo de agitação, temperatura, adição de sais, tempo de extração e solvente de limpeza (Socas-Rodríguez et al. 2017). Quanto às amostras, é importante que estas sejam adequadamente trituradas para maximizar a área superficial, assegurando uma melhor eficiência de extração (M. González-Curbelo et al. 2015).

Solvente de extração

Quanto aos solventes de extração, têm sido utilizados solventes polares como acetona, acetato de etilo e acetonitrilo (ACN). Apesar do ACN ser miscível em água, é um solvente adequado para extrair compostos polares e não polares, podendo ser separado da fase aquosa por efeito de *salting out* antes da etapa d-SPE, enquanto que, a acetona só pode ser separada da fase aquosa através da adição de um co-solvente apolar (Kivrak et al. 2018; Socas-Rodríguez et al. 2017). O acetato de etilo também pode ser um bom solvente de extração, embora a principal desvantagem seja a sua capacidade de perder pesticidas básicos em matrizes ácidas (Narendran et al. 2020). Por outro lado, o ACN apresenta uma menor volatilidade que a acetona e que o acetato de etilo e é um solvente compatível com aplicações de cromatografia gasosa e cromatografia líquida (Socas-Rodríguez et al. 2017).

Alguns procedimentos recorrem à adição de 1% (v/v) de ácido acético em ACN (Varela-Martínez et al. 2019), uma vez que os valores de pH de frutas e vegetais tendem a estar compreendidos entre 2,5 e 6,5 e alguns pesticidas degradam-se a valores de pH elevados. A adição de ácido acético vai permitir que os pesticidas permaneçam mais estáveis em extratos de ACN. Este passo é mais relevante quando as amostras são armazenadas por um certo período de tempo antes da injeção, portanto, quando se trata de um curto tempo entre a extração e a injeção pode-se evitar a adição de ácido (Socas-Rodríguez et al. 2017).

Dependendo das características das matrizes a ser analisadas, pode ser necessária a adição de um determinado volume de água à amostra no início do processo. Este passo vai facilitar a extração para matrizes com menos de 80% de teor de água, como cereais, farinhas, frutos secos, entre outros. A água vai permitir enfraquecer as interações entre o analito e a matriz, possibilitando uma partição adequada (Socas-Rodríguez et al. 2017).

Salting-out

A introdução de um sal para efeito de *salting-out* aumenta a recuperação de pesticidas polares e controla a percentagem de água na fase orgânica. Para este efeito podem ser usados vários sais, como sulfato de magnésio ($MgSO_4$), cloreto de magnésio ($MgCl_2$), nitrato de sódio ($NaNO_3$), cloreto de sódio ($NaCl$), sulfato de sódio (Na_2SO_4), cloreto de lítio ($LiCl$), e frutose (M. González-Curbelo et al. 2015). Geralmente recorre-se à combinação de $MgSO_4$ com $NaCl$, dado que o $MgSO_4$ tem a capacidade de remover moléculas de água e secar a fase orgânica de forma mais eficaz quando comparado com outros sais, enquanto que o $NaCl$ favorece o efeito de *salting-out* e permite uma separação de fases ainda mais completa (Lawal et al. 2018). No entanto, deve-se ter em consideração que esses sais também podem afetar os instrumentos analíticos utilizados, portanto, a fim de evitar a deposição dos sais nos instrumentos, o $NaCl$ e o $MgSO_4$ podem ser substituídos por sais de amónio (M. Á. González-Curbelo et al. 2014).

É necessário ter em conta que a temperatura durante o processo QuEChERS pode afetar o desempenho do método. A reação exotérmica que ocorre após a adição de $MgSO_4$ à amostra pode causar a degradação de analitos mais sensíveis a temperaturas elevadas. Portanto, para reduzir esse efeito, como alternativa pode-se congelar a amostra antes da extração inicial ou adicionar água fria ($< 4\text{ }^\circ\text{C}$), caso seja necessária a adição de água (Socas-Rodríguez et al. 2017).

Limpeza d-SPE

O método de extração em fase sólida dispersiva (d-SPE) é uma modificação do SPE convencional e é adequado para limpar interferências da matriz, uma vez que permite reduzir a quantidade de compostos extraídos que podem interferir na determinação correta dos analitos (Socas-Rodríguez et al. 2017).

O PSA remove eficientemente as interferências polares, incluindo ácidos gordos, outros ácidos orgânicos e açúcares, enquanto que o C₁₈ é eficaz para remover interferências apolares, como lípidos e gorduras. Quanto ao uso de GCB, este permite eliminar os pigmentos, como clorofila e carotenóides (M. González-Curbelo et al. 2015).

Existem outros adsorventes que também podem ser utilizados na etapa de limpeza d-SPE, por exemplo, têm sido aplicados novos materiais à base de óxido de zircônio para remoção de lípidos. O uso destes materiais pode vir a ser mais eficaz face ao uso de PSA e C₁₈, tanto na remoção de gorduras como de pigmentos, proporcionando maiores valores de recuperação (Tuzimski et al. 2016). Além disso, também podem ser utilizados materiais de limpeza como alumina, para eliminação de lípidos; silicato de magnésio, para separar analitos apolares; nanomateriais como nanotubos de carbono ou nanopartículas magnéticas, que se destacam por apresentarem elevada área superficial e capacidade de extração (Socas-Rodríguez et al. 2017).

1.8. SEPARAÇÃO E DETEÇÃO DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS

O controlo de resíduos de pesticidas é uma das atividades mais importantes para garantir a segurança alimentar. O elevado número de substâncias ativas combinado com os baixos limites permitidos por lei e com as exigências dos métodos analíticos, tornam a análise de resíduos de pesticidas num trabalho desafiante (Špánik et al. 2018). De acordo com o guia SANTE/11312/2021 a análise e quantificação de resíduos de pesticidas em matrizes alimentares requer a utilização de métodos de cromatografia acoplados a espectrometria de massa para garantir sensibilidade suficiente (SANTE/11312/2021, 2021).

Existem diversas técnicas utilizadas para separação de resíduos de pesticidas em alimentos, embora a cromatografia gasosa (GC) e a cromatografia líquida de alta ou ultra eficiência (HPLC ou UHPLC) sejam as técnicas mais aplicadas. Estes sistemas de separação podem ser acoplados a espectrómetros de massa (MS) para identificação e quantificação de pesticidas. Podem ser usados vários sistemas de deteção MS, como quadrupolo simples ou triplo, armadilha de iões, tempo-de-voe (TOF) ou orbitrap. Como técnica de ionização, existem opções como a ionização de eletrões (ou ionização por impacto de eletrões, EI), ionização química (CI), ionização química à pressão atmosférica (APCI) e ionização por eletrospray (ESI). Os equipamentos de MS podem operar com diferentes modos de aquisição, como varrimento completo, monitorização de iões seletivos (SIM), atualmente denominado por monitorização de reação única (SRM) ou monitorização de reações múltiplas (MRM), (SANTE/11312/2021, 2021; Alcântara et al. 2019). Na figura 5 encontra-se representada de uma forma esquematizada a variedade de instrumentos e técnicas disponíveis para separação e deteção de pesticidas em alimentos.

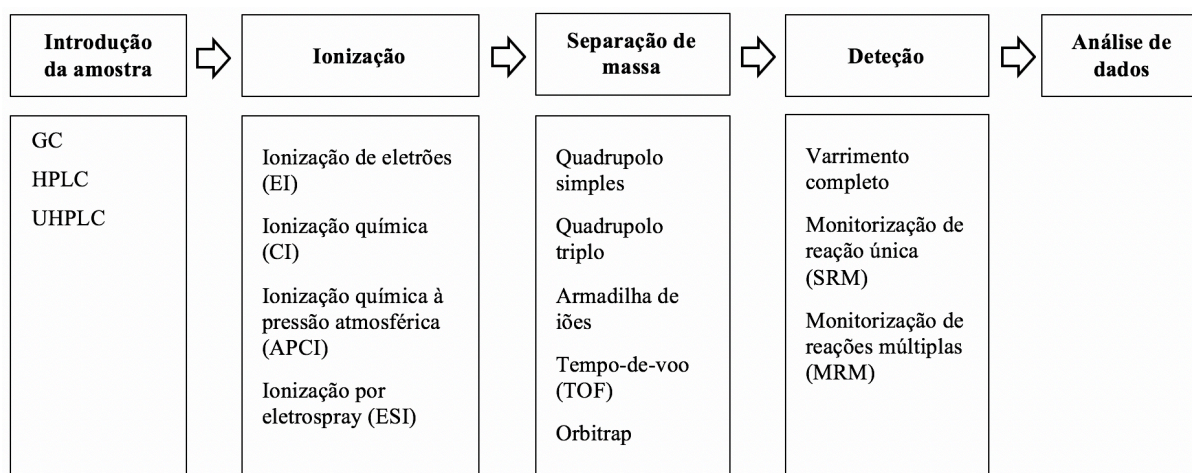


Figura 5 – Técnicas analíticas disponíveis para a análise de pesticidas em matrizes alimentares.

1.9. GC-MS/MS

Neste trabalho foi usada a técnica de cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massa quadrupolo triplo (GC-MS/MS) para validar dois pesticidas em alimentos de alto teor de gordura. Recorreu-se à técnica de ionização de elétrons (EI) e o modo de aquisição empregue foi a monitorização de reações múltiplas (MRM). GC-MS/MS é um método analítico rigoroso que combina um excelente poder de separação de GC com uma identificação minuciosa baseada na fragmentação da molécula (Špánik et al. 2018).

Esta técnica tem sido recentemente aplicada em análises multirresíduos de alimentos devido ao seu bom desempenho analítico, comprovado pela elevada seletividade e repetibilidade, excelente eficiência e boa resolução cromatográfica na análise de pesticidas em matrizes complexas (Alcântara et al. 2019). Além disso, a detecção por espectrometria de massa através da ionização de elétrons possibilita a pesquisa de informações duplas (tempo de retenção e espectro de fragmentação da molécula) por comparação com bibliotecas espectrais, permitindo a confirmação do componente a ser investigado. Este é um dos atributos mais valiosos do GC-MS/MS (Rey-Stolle et al. 2022; Alcântara et al. 2019). Quanto ao modo de MRM, este método de aquisição permite melhorar a seletividade e sensibilidade, assim como diminuir os limites de detecção e quantificação (Alcântara et al. 2019).

Neste trabalho foi utilizado um equipamento GC-MS/MS de triplo quadrupolo, modelo EVOQ GC-TQ (representado na Figura 6). De acordo com o fabricante, este modelo permite uma melhor sensibilidade e possibilita um maior número de transições, obtendo mais dados para cada pico cromatográfico; apresenta também um ajuste simples e um sinal de ruído mais baixo; além disso, permite uma fácil configuração do método MRM e o detetor requer apenas uma injeção, economizando tempo e fornecendo resultados mais rápidos e precisos. Este equipamento é ideal para testar uma ampla gama de resíduos de pesticidas em alimentos (“Bruker” 2023).

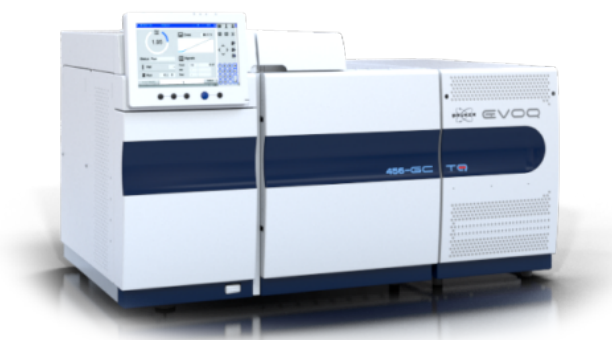


Figura 6 - GC-MS/MS, modelo EVOQ GC-TQ (imagem retirada do site do fabricante, <https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/mass-spectrometry/triple-quads.html>).

Separação por cromatografia gasosa

A primeira etapa numa análise por GC-MS/MS é a separação por cromatografia gasosa, no qual a solução da amostra é injetada na entrada do GC, normalmente entre 0,1 a 2 μL , e é direcionada, em forma de vapor, para a coluna cromatográfica. Esta etapa ocorre através de um gás de arraste, geralmente

o hélio. As moléculas da amostra são depois separadas através de diferentes interações entre a fase do gás de arraste e a fase estacionária. Nesta etapa, a escolha da coluna capilar desempenha um papel essencial na qualidade dos resultados, de forma a que se obtenha a melhor resolução possível (Wittmann 2007).

As colunas mais utilizadas em análises de GC eram as chamadas colunas do tipo 1, compostas por 100% de dimetilpolissiloxano, ou as colunas do tipo 5, compostas por 5% de difenilpolissiloxano e 95% de dimetilpolissiloxano. No entanto, algumas colunas do tipo 5 têm desativações inadequadas, sensibilidade reduzida e menor vida útil. Neste contexto, surgiram as colunas capilares Rxi®-5Sil MS como uma opção robusta e versátil que permite melhorar o desempenho cromatográfico e simplificar as operações no laboratório. Estas colunas são compostas por uma fase de silarileno, como mostra a figura 7, que oferece maior estabilidade e seletividade para uma ampla gama de compostos, face às colunas do tipo 5 (Restek, 2022).

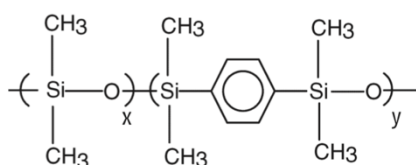


Figura 7 - Composição da coluna Rxi®-5Sil MS.

As colunas Rxi®-5Sil MS apresentam uma excelente inércia para compostos ativos e são indicadas para a análise GC de compostos semivoláteis, aromáticos policíclicos, hidrocarbonetos clorados, ftalatos, fenóis, aminas, pesticidas organoclorados, pesticidas organofosfatos, drogas e hidrocarbonetos, apresentando assim uma grande versatilidade (“Shimadzu” 2023).

A inércia da coluna permite melhorar a forma do pico, garantindo picos de formato simétrico, o que influencia na relação sinal/ruído e, portanto, na sensibilidade analítica. Além disso, a inércia da coluna também afeta a estabilidade do tempo de retenção, possibilitando uma correta identificação do pico (Restek, 2022).

Ionização de elétrões

A EI é usada em GC-MS/MS para ionizar e fragmentar moléculas antes da análise e detecção por espectrometria de massa (“Chromatography Online” 2023). A saída da coluna cromatográfica é conectada ao MS por um dispositivo de transferência aquecido com uma fonte de ionização de elétrões onde os compostos eluídos da coluna são posteriormente ionizados (Wittmann 2007).

Mais concretamente, a interferência do analito com um fluxo de elétrões leva à perda de um elétron nos átomos que formam as moléculas da amostra, produzindo-se um catião. Os cátions resultantes da ionização vão suportar a massa total de cada analito. Devido à grande quantidade de energia transmitida ao catião, este normalmente sofre fragmentação ou uma reação de rearranjo, dando origem a outros íões menores que, juntamente com a razão massa-carga e a intensidade dos íões originais fornecem uma impressão digital para aquela estrutura molecular. Esta informação pode depois ser usada para deduzir a química do analito ou comparar com bibliotecas espetraais para devida identificação

(“Chromatography Online” 2023). A figura 8 representa esquematicamente a fonte de ionização de elétrons e o sistema quadropolo para detecção do analito (Wittmann 2007).

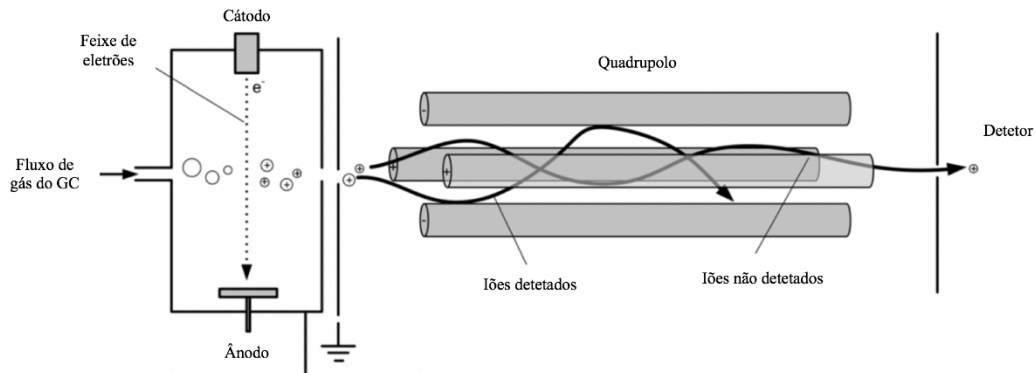


Figura 8 - Esquema relativo ao método de ionização de elétrons e ao sistema quadropolo (imagem retirada de Wittmann 2007).

Separação de massa

Através de uma fenda, os íons positivos provenientes da fonte de ionização entram no processo de separação de massa, que, neste caso, ocorre através de um sistema de quadropolo triplo. Cada quadropolo é composto por quatro hastes cilíndricas paralelas, com cerca de 25 cm de comprimento cada uma, no qual as hastes opostas conectam-se eletricamente. A separação de massa é baseada no movimento de íons num campo elétrico oscilante criado pela variação de tensão entre as hastes. Tendo em conta uma certa gama de relação massa/carga (m/z) selecionada, apenas os íons com relação m/z correspondente passam para o detector, enquanto que os íons que apresentam uma relação m/z diferente são sujeitos a oscilações que levam à sua colisão com as hastes, não chegando ao detector (Wittmann 2007).

Como se verifica na figura 9, um quadropolo triplo resulta da ligação entre três quadropolos em sucessão. Depois de filtrados no primeiro quadropolo, os íons passam por uma célula de colisão, segundo quadropolo, preenchido por um gás de colisão (mistura de azoto e hélio) onde são fragmentados. Os íons fragmentados provenientes da célula de colisão passam finalmente pelo terceiro quadropolo onde voltam a ser filtrados (Agilent 2019).

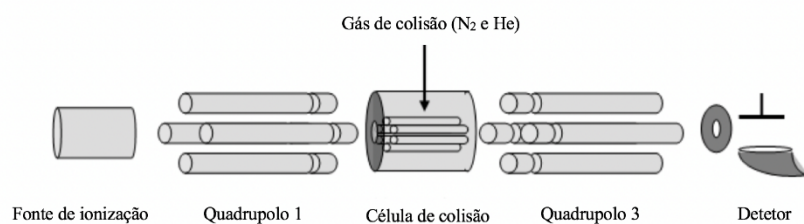


Figura 9 - Esquema relativo a um quadropolo triplo (imagem retirada de Agilent 7000/7010 Series Triple Quadrupole GC/MS System Concepts Guide).

1.10. VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE

O objetivo de um método analítico é fornecer dados consistentes, confiáveis e precisos, do qual advém a importância da validação. A validação de um método é um requisito dos organismos de acreditação e consiste na confirmação, por meio de exames minuciosos, de que o procedimento é efetivamente aplicável para o fim a que se destina. Para tal é necessário demonstrar que o procedimento experimental, processo, equipamento, reagentes e condições de laboratório escolhidos para o método funcionarão adequadamente num conjunto fixo de condições (Peris-vicente 2015).

Um método analítico deve ser validado sempre que é implementado num laboratório, ou quando ocorre alguma alteração relevante no mesmo (Guia RELACRE 13, 2000). Uma vez validado um método, este permanece validado enquanto for aplicado no mesmo laboratório e nas mesmas condições experimentais (Peris-vicente 2015).

Validar um método é extremamente necessário e importante, uma vez que a validação verifica se um método é adequado para ser usado em situações de controlo de qualidade e apoio à investigação e a validação deve ser implementada pelos laboratórios para provar que conseguem obter dados analíticos com o valor correto e com certeza da sua confiabilidade. Por outro lado, o uso de um método validado elimina repetições de testes e aumenta o prestígio do laboratório, atraindo mais clientes pela confiança do trabalho, o que resulta em rentabilidade e economia de tempo a longo prazo (Peris-vicente 2015).

Embora haja um consenso geral das organizações sobre a forma como a validação pode ser realizada, atualmente existe alguma diversidade nos detalhes da validação, tanto nos parâmetros como nos critérios de aceitação, que advém da existência de um grande número de guias e protocolos. Assim, como existem diversas organizações internacionais e diferentes áreas envolvidas na validação de métodos, cabe a cada uma emitir as suas diretrizes de validação, descrevendo os parâmetros de validação que devem ser estudados e os critérios de aceitação. Portanto, de acordo com o método a validar, é importante que cada analista selecione cuidadosamente as diretrizes e os protocolos que pretende seguir (Peris-vicente 2015).

Para validação de um método multiresíduo de análise de pesticidas em alimentos de alto teor em gordura, foram seguidos os parâmetros e os critérios de validação descritos no guia SANTE/11312/2021. De acordo com o este guia, a validação de um método deve incluir a avaliação da sensibilidade/ linearidade; limite de quantificação (LQ); recuperação média, para avaliar a exatidão e precisão avaliada através da repetibilidade e precisão intermédia. Para além destes aspetos de avaliação quantitativa, os parâmetros de identificação também devem ser avaliados, tais como, a razão iónica e o tempo de retenção. Para validação de métodos multiresíduos deve ser escolhida, no mínimo, uma matriz representativa de cada grupo alimentar (SANTE/11312/2021, 2021).

Especificidade e Seletividade

Os termos especificidade e seletividade relacionam-se entre si como a capacidade de um método identificar e distinguir o analito que se pretende analisar numa matriz complexa, sem que haja interferência de outros componentes (Guia RELACRE 13, 2000).

Em cromatografia, o equipamento deve ser capaz de reconhecer o pico do analito entre os vários picos do cromatograma e assim discriminar interferentes que possam estar presentes na matriz (Peris-vicente 2015). Esse reconhecimento pode ser confirmado pela comparação do tempo de retenção e da

razão iónica entre os padrões e a amostra que se pretende analisar. O tempo de retenção (TR) de um composto corresponde ao tempo que decorre desde a injeção no sistema até à sua deteção (Marques 2019). A razão iónica (RI) representa a razão entre o pico correspondente ao ião menos intenso (qualificador) e o pico do ião mais intenso (quantificador) (Ribeiro 2021). De acordo com os critérios estabelecidos no SANTE/11312/2021, o analito alvo não deve desviar mais do que 0,1 da média dos TR dos padrões da reta de calibração e a RI não deve desviar mais do que 30% da RI média.

A especificidade e seletividade podem ser avaliadas através de ensaios de recuperação, recorrendo a uma matriz complexa. O método é considerado específico e seletivo quando as taxas de recuperação obtidas são próximas de 100% (Guia RELACRE 13, 2000).

Linearidade e Gama de trabalho

A linearidade é a capacidade do método em obter resultados de teste, que são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra (Kruve et al. 2015a; 2015b) e deve ser avaliada em toda a faixa de trabalho do método analítico, recomendando-se um mínimo de cinco pontos de calibração distribuídos de igual modo na gama de concentração (Guia RELACRE 13, 2000). Este parâmetro está intimamente relacionado com a escolha da gama de trabalho e com o modelo de calibração.

A linearidade e a gama de trabalho podem ser testadas recorrendo a soluções padrão ou amostras da matriz em branco fortificadas, no qual o extrato da matriz é enriquecido com uma quantidade de analito conhecida. No caso da análise em GC, esta última opção é preferível para ter em consideração a possível influência da matriz na ionização do analito. Neste caso, o mais adequado é usar extratos de matriz em branco do tipo de matriz mais semelhante possível à amostra (Kruve et al. 2015a; 2015b).

Gama de Trabalho

A gama de trabalho pode ser entendida como o intervalo entre a quantidade mínima (limite inferior de quantificação) e a quantidade máxima (limite superior de quantificação) em amostras, no qual o procedimento analítico é capaz de fornecer resultados quantitativos com um nível adequado de linearidade (Peris-vicente 2015).

Este parâmetro pode ser avaliado pelo teste de homogeneidade das variâncias, no qual o primeiro e o último padrão da reta de calibração são analisados em 10 réplicas independentes. Determinam-se depois as variâncias associadas a estes dois padrões de forma a verificar se existem diferenças significativas entre elas. As diferenças de variância são calculadas efetuando-se o teste PG, de acordo com as equações 1 e 2, onde S_1^2 e S_6^2 correspondem às variâncias associadas ao primeiro e último padrão, respetivamente.

$$\text{Se } S_1^2 < S_6^2, \text{ então } PG = \frac{S_6^2}{S_1^2} \quad (1)$$

$$\text{Se } S_1^2 > S_6^2, \text{ então } PG = \frac{S_1^2}{S_6^2} \quad (2)$$

O valor de PG obtido é comparado com o valor tabelado da distribuição de F de Snedecor / Fisher, para n-1 graus de liberdade. Caso $PG \leq F$, as diferenças de variâncias não são significativas e pode-se afirmar que a gama de trabalho está bem ajustada (Guia RELACRE 13, 2000).

Linearidade

Para o estudo da linearidade estabelece-se um gráfico de calibração (sinal do equipamento em função da concentração) e determina-se a concentração das amostras por interpolação (Guia RELACRE 13, 2000). Nos métodos cromatográficos o sinal do equipamento corresponde à área do pico, e, neste caso, a área do pico e a concentração relacionam-se através de uma equação de primeiro grau, Equação 3, em que y representa a área do pico do analito, m representa o declive da reta, x representa a concentração de analito, e b representa a ordenada na origem (Peris-vicente 2015).

$$y = mx + b \quad (3)$$

Para avaliar a linearidade os dados podem ser tratados por regressão linear e pelo método dos mínimos quadrados para calcular as constantes da curva de calibração e avaliar a qualidade da relação linear, através do coeficiente de correlação (Peris-vicente 2015). O coeficiente de correlação calcula-se de acordo com a equação 4, podendo tomar valores entre -1 e +1 e, para calibração linear, devem ser sempre superiores a 0,995. Na equação, N representa o número de pontos da reta, x_i e y_i os pares ordenados, \bar{x} a média dos valores de x e \bar{y} a média dos valores de y (Guia RELACRE 13, 2000).

$$\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 (4)$$

Outra forma de avaliar a linearidade é através do teste de *Mandel*, no qual, se calcula a função de calibração linear e a função de calibração não linear, assim como as respetivas variâncias. A diferença das variâncias associadas às duas funções é calculada através da equação 5, em que N corresponde ao número de padrões de calibração e $S_{y/x}^2$ e S_{y2}^2 são as variâncias associadas à função linear e à função não linear, respetivamente (Guia RELACRE 13, 2000).

$$DS^2 = (N - 2) \times S_{y/x}^2 - (N - 3) \times S_{y2}^2 \quad (5)$$

Calcula-se depois o valor de teste PG pela equação 6.

$$PG = \frac{DS^2}{S_{y2}^2} \quad (6)$$

Se o valor de teste for inferior ao valor tabelado da distribuição de F de Snedecor / Fisher, conclui-se que a função de calibração é linear, caso contrário a gama de trabalho deve ser reduzida de forma a se obter uma função linear.

De acordo com o SANTE/11312/2021, como critério de aceitação para a linearidade, o desvio entre a concentração obtida e a concentração esperada não pode ser superior a 20%. Portanto, neste trabalho a linearidade também foi avaliada através da análise de resíduos.

O valor da análise de resíduos calcula-se de acordo com a equação 7 consiste no cálculo percentual da diferença entre as concentrações experimentais e as concentrações calculadas a partir da equação da reta de calibração (Kruve et al. 2015a; 2015b).

$$\% \text{ Desvio das concentrações} = \frac{C_{\text{experimental}} - C_{\text{calculada}}}{C_{\text{calculada}}} \times 100 \quad (7)$$

Limiares analíticos

Os limiares analíticos, limite de deteção (LD) e limite de quantificação (LQ), permitem avaliar a capacidade do método de detetar, identificar e quantificar níveis baixos de analito em amostras (Kruve

et al. 2015a; 2015b). É importante ter em consideração que, tanto o LD como o LQ devem ser determinados na amostra da matriz (Peris-vicente 2015).

O LD pode ser entendido como a menor concentração do analito na amostra que é possível detetar, ou seja, que pode ser distinguida do zero com uma certeza estatística razoável (Kruve et al. 2015a; 2015b). Neste caso, a presença do analito na amostra pode ser avaliada, mas não quantificada com exatidão e precisão aceitáveis (Peris-vicente 2015). Quando o método envolve a utilização de uma calibração linear, o LD pode ser calculado recorrendo à equação 8, onde $S_{y/x}$ representa o desvio padrão da curva de calibração linear e b é o declive da mesma (Guia RELACRE 13, 2000).

$$LD = \frac{[3,3 \times S_{y/x}]}{b} \quad (8)$$

Quanto ao LQ, este corresponde à menor concentração de analito que pode ser quantificada e relatada, com uma determinada exatidão e precisão. Uma vez que o método envolve a utilização de uma calibração linear, o LQ é obtido através da equação 9, onde $S_{y/x}$ representa o desvio padrão da curva de calibração linear e b é o declive da mesma (Guia RELACRE 13, 2000).

$$LQ = \frac{[10 \times S_{y/x}]}{b} \quad (9)$$

Conforme os critérios do SANTE/11312/2021, para fins de validação, o LQ não deve ser superior ao LMR estabelecido para o analito e matriz em estudo (SANTE/11312/2021, 2021).

Precisão

A precisão pode ser definida como a proximidade da concordância entre os valores obtidos de várias medições independentes para a mesma amostra, sob condições específicas. Em cromatografia, representa a concordância entre os valores obtidos da área do pico num cromatograma, a partir de análises independentes da mesma matriz (Peris-vicente 2015). A precisão está associada a erros aleatórios num sistema de medição e é um componente da incerteza (Kruve et al. 2015a; 2015b).

Este parâmetro pode ser avaliado através de duas medidas extremas, a repetibilidade e a reprodutibilidade, ou através de uma situação intermédia designada por precisão intermédia (Peris-vicente 2015). Quando a validação de um método ocorre num único laboratório não existe necessidade de avaliar a reprodutibilidade (Ribeiro 2021).

Repetibilidade

A repetibilidade expressa a precisão de um método perante condições idênticas. Assim, refere-se à proximidade dos resultados obtidos para a mesma amostra em condições de repetibilidade, ou seja, sem variar o laboratório, o procedimento, o operador, o equipamento e os reagentes durante um curto período de tempo, geralmente um dia ou uma corrida analítica. A repetibilidade deve fornecer a menor variação possível entre os resultados (Kruve et al. 2015a; 2015b).

Para avaliar a repetibilidade efetuam-se no mínimo dez medições sobre a mesma amostra em condições de repetibilidade e calculam-se o desvio padrão, variância e coeficiente de variação associados aos resultados da repetibilidade, assim como, o limite de repetibilidade. O limite de repetibilidade (r) consiste no valor abaixo do qual se deve situar, com uma probabilidade definida, a

diferença absoluta entre dois resultados de ensaio. Para um nível de confiança de 95%, o limite de repetibilidade calcula-se de acordo com a equação 10, no qual S_r^2 representa a variância da repetibilidade (Guia RELACRE 13, 2000).

$$r = 2,8 \times \sqrt{S_r^2} \quad (10)$$

De acordo com os critérios do SANTE/11312/2021, para fins de validação, o coeficiente de variação da repetibilidade não deve ser superior a 20% (SANTE/11312/2021, 2021).

Precisão Intermédia

A precisão intermédia é a precisão obtida no mesmo laboratório, para a mesma amostra, durante um período de tempo mais longo, geralmente vários meses, e tem em consideração mais mudanças do que a repetibilidade. Na prática, fazem-se variar uma ou mais condições, como, diferentes analistas, equipamentos e/ou épocas. Também variam fatores que normalmente são constantes durante um dia, mas não são constantes durante um período de tempo mais longo e, portanto, são fatores aleatórios no contexto de precisão intermédia (Kruve et al. 2015a; 2015b).

Para determinar este parâmetro, efetuam-se n medições para a mesma amostra em condições de precisão intermédia e calcula-se o desvio padrão da precisão intermédia de acordo com a equação 11, onde t corresponde ao número de amostras ensaiadas, n ao número de ensaios efetuados por amostra, j ao número da amostra, k ao número do resultado obtido para a amostra j , y_{jk} representa o resultado para a amostra j e \bar{y}_j a média dos resultados (Guia RELACRE 13, 2000).

$$S_i = \sqrt{\frac{1}{t(n-1)} \sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (y_{jk} - \bar{y}_j)^2} \quad (11)$$

Exatidão

A exatidão pode ser entendida como a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceite como verdadeiro (Guia RELACRE 13, 2000). Em análises cromatográficas, a exatidão vai corresponder à concordância entre a concentração obtida no ensaio (através da área do pico e da reta de calibração) e o valor de referência. Neste caso, recorre-se à média das concentrações obtidas de forma a minimizar o efeito dos erros aleatórios (Peris-vicente 2015).

Para avaliar a exatidão pode-se recorrer a materiais de concentração conhecida como materiais de referência certificados, amostras fortificadas, soluções padrão ou amostras reais analisadas por um método confiável de referência. Quando se avalia a exatidão recorrendo a amostras fortificadas, efetuam-se ensaios de recuperação, no qual uma amostra em branco é fortificada com uma quantidade conhecida de analito. Neste caso, a exatidão é determinada através de valores de recuperação (Peris-vicente 2015).

A recuperação é calculada de acordo com a equação 12, onde C_F corresponde à concentração da amostra fortificada, C_A à concentração da amostra e C_T corresponde à concentração teórica que foi realmente adicionada (Peris-vicente 2015).

$$\%R = \frac{(C_F - C_A)}{C_T} \times 100 \quad (12)$$

Idealmente, os valores de recuperação deveriam ser 100%, no entanto, num método de ensaio ocorrem erros sistemáticos que não permitem normalmente atingir esse valor (Peris-vicente 2015). Conforme o SANTE/11312/2021, para avaliar a recuperação é necessário um mínimo de cinco réplicas ao nível do LQ do método e pelo menos um outro nível superior, por exemplo, duas a dez vezes o nível do LQ, sendo aceites valores de recuperação compreendidos entre os 70% e 120%, com um coeficiente de variação associado inferior a 20% (SANTE/11312/2021, 2021).

Incerteza

Na análise cromatográfica, a incerteza caracteriza a distância máxima entre uma concentração medida e o valor real que pode ser obtido ao analisar uma amostra. Assim, este parâmetro vai quantificar o nível de dúvida sobre a concentração obtida, resultante de erros aleatórios provenientes de diversas fontes possíveis do método (Peris-vicente 2015).

Existem várias metodologias aceites para calcular incertezas num laboratório. A escolha da metodologia de cálculo vai depender dos recursos disponíveis, bem como dos objetivos do ensaio. Neste trabalho o cálculo da incerteza baseou-se em abordagens empíricas de acordo com os dados obtidos da validação do método, recolhidos em condições intralaboratoriais. Esta abordagem envolve a combinação de duas componentes de incerteza: a incerteza padrão associada aos erros aleatórios, designada por incerteza de precisão/ fidelidade ($u_{\text{precisão}}$) e a incerteza padrão associada aos erros sistemáticos, mais concretamente, a incerteza de veracidade/ justeza ($u_{\text{veracidade}}$) (Guia RELACRE 31, 2018).

Incerteza de precisão

A incerteza pode ser calculada como incerteza absoluta ou incerteza relativa, desde que as componentes da incerteza sejam contabilizadas na mesma dimensão. A incerteza padrão associada à precisão é avaliada em condições de precisão intermédia, sendo que a incerteza padrão absoluta associada à precisão ($u_{\text{precisão}}$) é calculada diretamente pelo desvio-padrão absoluto da precisão intermédia, enquanto que a incerteza padrão relativa associada à precisão ($u'_{\text{precisão}}$) corresponde ao desvio padrão relativo da precisão intermédia, ou seja, ao coeficiente de variação da precisão intermédia (Guia RELACRE 31, 2018).

Incerteza de veracidade

Quanto à incerteza padrão associada à veracidade ($u_{\text{veracidade}}$), esta pode ser avaliada de diversas formas, e, neste caso, foi calculada tendo em conta os ensaios de recuperação. Esta componente da incerteza foi calculada de acordo com a equação 13, no qual R corresponde à recuperação, s_{obs} ao desvio padrão dos resultados dos ensaios de recuperação, n ao número de ensaios efetuados e \bar{c}_{obs} à concentração média dos ensaios de recuperação (Guia RELACRE 31, 2018).

$$u_{\text{veracidade}} = R \times \frac{s_{\text{obs}}}{\bar{c}_{\text{obs}} \times \sqrt{n}} \quad (13)$$

Incerteza combinada

A incerteza combinada ($u_{\text{combinada}}$) tem em consideração todas as componentes de incerteza associadas ao método analítico e é calculado tendo em conta a Lei da Propagação das Incertezas, no qual as componentes da incerteza descritas anteriormente podem ser combinadas de acordo com a equação 14, onde $u_{\text{precisão}}$ corresponde à incerteza absoluta associada à precisão e $u_{\text{veracidade}}$ à incerteza padrão associada à veracidade (Guia RELACRE 31, 2018).

$$u_{\text{combinada}} = \sqrt{u_{\text{precisão}}^2 + u_{\text{veracidade}}^2} \quad (14)$$

Incerteza expandida

A incerteza expandida (U) é calculada de acordo com a equação 15, ou seja, através da incerteza combinada e considerando um fator de expansão (K). Quando a incerteza é calculada recorrendo a um número elevado de ensaios experimentais, considera-se um fator de expansão igual a 2 e um nível de confiança de 95% (Guia RELACRE 31, 2018).

$$U = u_c \times K \quad (15)$$

CAPÍTULO II – PARTE EXPERIMENTAL

2.1. MATERIAL E REAGENTES

Material e equipamento

Para além do material corrente de laboratório utilizado ao longo do trabalho experimental, foram necessários diversos equipamentos auxiliares, como moinhos trituradores GM 200 da marca *Retsch* para a preparação das amostras, assim como, balança analítica modelo MS204S, da marca *Mettler Toledo* e de incerteza $\pm 0,0001$ g, agitador *multi reax* da marca *Heidolph*, centrífuga Rotina 380 da marca *Hettich* com um rotor *Swing-out 4 place 1754* também da *Hettich*, e evaporador de corrente de azoto *TurbVap LV* da marca *Biotage*. Também se utilizaram filtros de seringa de nylon (25 mm, 0,45 μ m) da VWR e seringas descartáveis de 3 peças, *luer-lock* de 5 mL da *Henke Sass Wolf*. Para a preparação da reta de calibração utilizaram-se seringas de vidro da VWR de 10, 25, 50 e 100 μ L e uma seringa de vidro da *Trajan* de 1 mL.

Para a análise de resíduos de pesticidas recorreu-se ao equipamento de GC SCION 456-GC da marca *Bruker* acoplado ao equipamento de MS/MS EVOQ TQ da *Bruker*.

Amostras e reagentes

A validação do método de análise de resíduos de pesticidas envolveu duas matrizes diferentes do grupo 4a (elevado teor de óleo e baixo teor de água) do SANTE/11312/2021 (Procedimentos analíticos de controle de qualidade e validação de métodos para análise de resíduos de pesticidas em alimentos e rações, implementado em 01/01/2022): amêndoa e amendoim.

Para a extração de pesticidas utilizaram-se três solventes: acetonitrilo (CH_3CN , grau UHPLC-MS, *Carlo Erba Reagents*), tolueno ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$, grau PESTIPUR, *Carlo Erba Reagents*) e água MilliQ (sistema de purificação da marca *Milipore*). Recorreu-se ao uso de kits QuEChERS QuE-Lab (*Lab Instruments*): kit 1 - composto por 4 g de sulfato de magnésio, 1 g de cloreto de sódio, 0,5 g de citrato de sódio desidratado básico e 1 g de citrato de sódio desidratado tribásico; e kit 3 - composto por 150 mg de PSA, 150 mg de C_{18} e 900 mg de sulfato de magnésio.

Para os ensaios de recuperação e para a reta de calibração utilizaram-se duas soluções padrão de pesticidas, a solução padrão A e a solução padrão B, cuja composição se encontra descrita abaixo.

Preparação da solução padrão A

A solução padrão A de 1 ppm foi obtida a partir de nove soluções comerciais de misturas de padrões pesticidas de 100 ppm: GC1 (cat. 32563); GC2 (cat. 32564); GC3 (cat. 32565); GC4 (cat.32566); GC5 (cat. 32567); GC6 (cat. 32568); GC7 (cat. 32569); GC8 (cat. 32570) e GC9 (cat. 32571), da marca *Restek*. Os pesticidas que compõem cada solução encontram-se especificados no **Apêndice A**.

Para preparar a solução padrão A, retiraram-se 200 μ L de cada solução de mistura de 100 ppm (do GC1 ao GC9) para um balão de 20 mL e perfez-se o volume final com tolueno.

Preparação da solução padrão B

A solução padrão B de 1 ppm foi preparada a partir de quatro soluções individuais de padrões de pesticidas de 1000 ppm. Os pesticidas utilizados para a preparação desta solução foram o pirifenox (pureza 98,71%), o fenpropidin (pureza 97,20%), o formotião (pureza 70,00%) e o dodemorfe (pureza 98,71%), da marca *DR Ehrenstorfer*.

Para preparar esta solução, retiraram-se 20 μL de cada solução padrão individual de 1000 ppm para um balão de 20 mL e perfez-se o volume final com tolueno.

2.2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Extração de pesticidas

Antes de se iniciar o procedimento da extração, as amostras (amêndoa e amendoim comerciais) foram previamente trituradas com auxílio de moinhos trituradores, apenas na parte a que o LMR se aplica, de acordo com o regulamento (UE) 2020/856 (de 9 de junho de 2020), (Comissão Europeia 2020). No caso das amêndoas e dos amendoins deve-se triturar o produto inteiro, após remoção das cápsulas, cascas e película.

Pesou-se cerca de $13,5 \text{ g} \pm 0,05 \text{ g}$ de amostra hidratada (na proporção de 1:1 de matriz: água (m/v)) para um tubo de centrifuga de 50 mL. De seguida adicionou-se 10 mL de acetonitrilo à amostra hidratada e agitou-se no *multi reax* durante 15 minutos, à temperatura ambiente. Adicionou-se 6,5 g do componente de extração do kit 1 QuEChERS e voltou-se a agitar durante 3 minutos. A amostra foi posteriormente centrifugada a 2918 RCF (*relative centrifugal force*) durante 5 minutos, sendo de seguida transferidos 6 mL do sobrenadante para um tubo de 15 mL de limpeza dSPE do kit 3 QuEChERS. O extrato foi novamente agitado durante 1 minuto e centrifugado durante 5 minutos a 4863 RCF, tendo-se depois transferido 1 mL do sobrenadante para um *vial* de 2 mL. Antes da análise por GC-MS/MS, o extrato foi evaporado a 20 °C em corrente de azoto, com uma pressão entre 1,5 e 2,5 psi, sendo de seguida o conteúdo do *vial* redissolvido com 1 mL de tolueno e filtrado. Finalmente procedeu-se à análise no GC-MS/MS (as condições cromatográficas encontram-se detalhadas na secção 2.2.4).

Ensaios de recuperação

Para os ensaios de recuperação pesou-se cerca de $13,5 \text{ g} \pm 0,05 \text{ g}$ de amostra hidratada (na proporção de 1:1 de matriz : água (m/v)) para um tubo de centrifuga de 50 mL e fortificou-se a amostra com 135 µL da solução padrão A e 135 µL da solução padrão B, de forma a se obterem recuperações de 13,5 ppb. Após secagem do volume adicionado (à temperatura ambiente) e da agitação da amostra no *multi reax* durante 1 minuto, prosseguiu-se com o procedimento descrito no ponto 2.2.1.

Reta de calibração

Para a reta de calibração preparam-se seis soluções padrão de volume final de 1 mL e concentrações de 5 ppb, 10 ppb, 25 ppb, 50 ppb, 75 ppb e 100 ppb a partir das soluções padrão A e B. A reta foi analisada em extrato de matriz de amêndoa ou de amendoim, dependendo do ensaio, e a preparação de cada solução encontra-se especificada na tabela 3.

Tabela 3 - Preparação das soluções para a reta de calibração a partir da solução A, da solução B e do extrato de matriz.

Concentração da solução de calibração final	Volume retirado da solução A	Volume retirado da solução B	Volume de extrato de matriz
5 ppb	5 µL	5 µL	990 µL
10 ppb	10 µL	10 µL	980 µL
25 ppb	25 µL	25 µL	950 µL
50 ppb	50 µL	50 µL	900 µL
75 ppb	75 µL	75 µL	850 µL
100 ppb	100 µL	100 µL	800 µL

Condições cromatográficas

A análise no GC-MS/MS ocorreu nas condições apresentadas na tabela 4.

Tabela 4 - Condições cromatográficas e parâmetros de MS/MS estabelecidas no equipamento GC-MS/MS para a validação do método.

GC	
Temperatura do injetor	280 °C
Temperatura do forno	90 °C (3,5 minutos) 180 °C (20°C por minuto) 325 °C (10 °C por minuto durante 5,5 minutos)
Gás de arraste	Hélio
Fluxo	1 mL / minuto
Modo de injeção	<i>Splitless</i>
Volume de injeção	2 µL
MS/MS	
Técnica de ionização	EI
Modo de aquisição	MRM
Energia de ionização	70 eV
Temperatura da fonte	280 °C
Temperatura da linha de transferência	280 °C

Validação

Para validar o método desenvolvido para a deteção de pesticidas em matrizes alimentares seguiram-se os parâmetros e os critérios de validação descritos nos guias SANTE (SANTE/11312/2021 2021) e RELACRE (Guia RELACRE 13 2000). Na tabela 5 encontra-se um resumo dos parâmetros avaliados, bem como os critérios de aceitação utilizados.

A linearidade e a gama de trabalho foram analisadas através da curva de calibração em matriz com seis pontos. A linearidade foi avaliada não só pela análise de resíduos, como também pelo teste de

Mandel, através da comparação das variâncias associadas a um ajuste linear e a um ajuste polinomial da curva de calibração, descrito em 1.10.2., enquanto que a gama de trabalho foi avaliada através do teste de homogeneidade de variâncias, no qual se efetuou a leitura de dez ensaios para o primeiro e último padrão da reta de calibração. Os limiares analíticos, LD e LQ foram calculados através do desvio padrão e do declive da reta de calibração.

A precisão e exatidão do método foram avaliadas recorrendo a ensaios de recuperação. A precisão foi avaliada através da repetibilidade, tendo-se efetuado dez medições sobre a mesma amostra recuperada sob condições de repetibilidade especificadas em 1.10.4, e através da precisão intermédia, no qual se avaliaram amostras recuperadas num período de cinco meses, em condições de precisão intermédia, também especificadas em 1.10.4.

A incerteza do método foi avaliada em condições de precisão intermédia e tendo em conta os ensaios de recuperação, tal como descrito em 1.10.6.

Tabela 5 - Parâmetros utilizados na validação do método desenvolvido e critérios de avaliação e de aceitação de cada parâmetro.

Parâmetro	Como avaliar	Critério de aceitação
Linearidade	Reta de calibração com 6 pontos Teste de <i>Mandel</i> Análise dos desvios-padrão residuais	$R^2 \geq 0,995$ Desvio da concentração calculada à concentração real $\leq 20\%$ $PG \leq F$
Gama de trabalho	Teste de homogeneidade das variâncias	$PG \leq F$
Limite de quantificação, LQ (experimental)	Nível de concentração mais baixo da validação no qual é possível a quantificação do analito, cumprindo os critérios de identificação e desempenho do método para a recuperação e precisão	$\leq LMR$
Repetibilidade	Coefficiente de variação de repetibilidade	$CV \leq 20\%$
Precisão intermédia	Coefficiente de variação de reprodutibilidade	$CV \leq 20\%$
Exatidão	Percentagem de recuperação para dois níveis de fortificação	$70\% < \text{recuperação} (\%) > 120\%$ $CV \leq 20\%$
Incerteza	Incerteza expandida do método, calculada através da incerteza combinada de acordo com as incertezas associadas à precisão e exatidão	$u_{\text{expandida}} \leq 50\%$
Tempo de retenção	Tempo de retenção das amostras em comparação ao tempo de retenção médio dos padrões de calibração	$\pm 0,1 \text{ min}$
Razão iónica	Razão iónica das amostras em comparação à razão iónica média dos padrões de calibração	$\pm 30\%$

CAPÍTULO III – RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO

No laboratório da SGS Portugal estão implementados dois métodos multiresíduos de análise de pesticidas em alimentos para o grupo 1 (elevado teor de água) e para o grupo 5 (elevado teor de amido e/ou proteína e baixo teor de água e gordura) do SANTE/11312/2021. Neste trabalho, foi desenvolvido um método para a análise de pesticidas em alimentos do grupo 4a (elevado teor de óleo e baixo teor de água), baseado no método de extração já implementado na SGS Portugal para a análise de pesticidas em alimentos de elevado teor de gordura e baixo teor de água. Numa fase inicial, foi realizado um estudo bibliográfico sobre cada etapa de extração com o objetivo de otimizar o método para as matrizes analisadas.

A análise de resíduos de pesticidas em matrizes alimentares é uma tarefa desafiadora, dada a elevada diversidade destas amostras, no que diz respeito ao teor de pigmentos, gorduras, açúcares, proteínas, antioxidantes e outras substâncias (Kaczyński 2017). Portanto, é fundamental definir as condições de extração mais adequadas a cada grupo alimentar. Neste trabalho, a escolha do solvente de extração e dos adsorventes de limpeza foi essencial para a otimização do método.

Vários autores já relataram diferentes metodologias de extração de resíduos de pesticidas em matrizes alimentares. Martínez et al. (2019) avaliaram três procedimentos diferentes (original, AOAC 2007.01 e CEN 15662, especificados na tabela 6) para extrair pesticidas de frutas desidratadas, tendo por base o método QuEChERS. O método AOAC 2007.01 apresentou os melhores resultados em termos de menor efeito de matriz, melhor eficiência de extração e melhor precisão. Desta forma, o ACN com 1% de ácido acético como solvente de extração e o sulfato de magnésio com o acetato de sódio para a etapa de limpeza d-SPE demonstraram ser as melhores condições de extração (Varela-Martínez et al. 2019)

Barci et al. (2020) também avaliaram três métodos de extração diferentes para determinar resíduos de 47 pesticidas em noz pecã: QuEChERS original, acetato QuEChERS e citrato QuEChERS (tabela 6). Os métodos QuEChERS original e citrato apresentaram melhores resultados quanto à menor quantidade de coextrativos, comparados com o método QuEChERS acetato. A adição inicial de água à amostra na proporção de 1:1 de matriz:água (m/v) foi necessária devido ao baixo teor de água da noz pecã (< 5%). Esta adição melhora a interação entre a amostra e o solvente de extração, resultando em melhores recuperações. Os sais sulfato de magnésio e cloreto de sódio do método original foram selecionados devido ao menor uso de sais em relação ao método citrato que requer quatro sais diferentes. Quanto à etapa de limpeza d-SPE, os adsorventes PSA e C18 demonstraram-se mais eficazes face a outros adsorventes, proporcionando melhores resultados para a remoção de lípidos (Barci et al. 2020).

Por outro lado, Mahdavi et al. (2019) otimizaram um processo de extração de resíduos de pesticidas em pistachos, onde os parâmetros avaliados foram a proporção amostra: água e as quantidades de adsorventes (tabela 6). Os autores concluíram que a adição de água à amostra na proporção de 1:1 matriz:água (m/v) foi suficiente para hidratar a amostra e para precipitar os compostos apolares presentes na matriz. Quanto ao procedimento de limpeza, uma etapa de *freeze-out* e o uso de aminas primárias e secundárias como adsorventes foi adequado para a obtenção de cromatogramas mais limpos e com menor efeito de matriz, não havendo a necessidade de utilizar C18 e GCB, reduzindo assim o custo e o tempo de análise (Mahdavi et al. 2020).

Tabela 6 - Resumo das adaptações ao método QuEChERS aplicadas à extração de pesticidas de matrizes alimentares.

(Martínez et al., 2019)			
	Original	AOAC 2007.01	CEN 1662
Amostragem	5 g de fruta desidratada	5 g de fruta desidratada	5 g de fruta desidratada
Solvente de extração	10 mL de ACN	10 mL de ACN com 1% (v/v) de ácido acético	10 mL de ACN
Hidratação da amostra	10 mL de H ₂ O	10 mL de H ₂ O	10 mL de H ₂ O
Salting out	4 g de MgSO ₄ , 1 g de NaCl	6 g MgSO ₄ , 1,5 g de acetato de sódio	4 g de MgSO ₄ , 1 g de NaCl, 1 g de citrato de sódio desidratado tribásico, 0,5 g de hidrogenocitrato dissódico sesquihidratado
Limpeza d-SPE	150 mg de MgSO ₄ , 50 mg de PSA, 50 mg C18	150 mg de MgSO ₄ , 50 mg de PSA, 50 mg C18	150 mg de MgSO ₄ , 25 mg de PSA, 25 mg C18
(Barci et al., 2020)			
	Original QuEChERS	Acetato QuEChERS	Citrato QuEChERS
Amostragem	5 g de noz	5 g de noz	5 g de noz
Hidratação da amostra	Adição de H ₂ O à amostra na proporção 1:1 matriz: água (m/v)	Adição de H ₂ O à amostra na proporção 1:1 matriz: água (m/v)	Adição de H ₂ O à amostra na proporção 1:1 matriz: água (m/v)
Solvente de extração	10 mL de ACN	15 mL de ACN com 1% de ácido acético (v/v)	10 mL de ACN
Salting out	4 g de MgSO ₄ , 1 g de NaCl	6 g de MgSO ₄ , 1,5 g de acetato de sódio	4 g de MgSO ₄ , 1 g de NaCl, 1 g de citrato de sódio desidratado tribásico, 0,5 g de hidrogenocitrato dissódico sesquihidratado
Limpeza d-SPE	300 mg de MgSO ₄ , 50 mg de PSA, 250 mg C18	300 mg de MgSO ₄ , 50 mg de PSA, 250 mg C18	300 mg de MgSO ₄ , 50 mg de PSA, 250 mg C18
(Mahdavi et al., 2019)			
Amostragem	5 g de pistachios		
Hidratação da amostra	Adição de H ₂ O à amostra na proporção 1:1 matriz: água (m/v)		
Solvente de extração	5 mL de ACN		
Salting out	4 g de MgSO ₄ , 1 g de NaCl		
Limpeza d-SPE	1,5 mg de MgSO ₄ , 250 mg de PSA		

Neste trabalho foi avaliada a proporção amostra:água na etapa de hidratação e a quantidade inicial de matriz a utilizar, bem como a adição de ácido acético ao solvente de extração. Numa fase inicial a extração foi efetuada para 5 g de amostra com adição de 10 mL de H₂O e 10 mL de ACN. Esta relação amostra-solvente não foi suficiente para atingir bons resultados de recuperação. Verificou-se posteriormente que a melhor proporção amostra:água a aplicar neste trabalho seria 1:1 (m/v), o que vai de encontro às conclusões obtidas por Barci et al. (2020) e Mahdavi et al. (2019).

Tanto as amêndoas como os amendoins são matrizes com baixo teor de água, portanto, é necessária a hidratação da amostra seca para alcançar a extração máxima do analito alvo (Cajka et al. 2012). Com a adição de água à amostra, é possível obter-se quatro fases na extração QuEChERS (orgânica, aquosa, resíduos sólidos da amostra e sais), enquanto que sem este procedimento não é possível a obtenção de uma fase aquosa, dificultando assim a extração. Apesar de, na ausência deste procedimento de hidratação, se obterem extratos mais limpos (com menos componentes polares da matriz), as recuperações de analito são afetadas negativamente (Cajka et al. 2012). Portanto, neste trabalho, a adição de água na proporção 1:1 matriz:água (m/v) foi suficiente para hidratar a amostra numa fase preliminar, sem afetar negativamente a quantidade de analito recuperada.

A adição de ácido acético ao solvente de extração impede a degradação dos pesticidas a valores de pH mais elevados, sendo assim importante para manter a estabilidade dos pesticidas em ACN. Neste caso, comparou-se a extração de resíduos de pesticidas utilizando ACN com 1% (v/v) de ácido acético e, apenas ACN como solvente de extração. A adição de ácido acético ao solvente de extração não favoreceu a análise dos pesticidas em questão (clorfenvinfos e malatião), por outro lado, a extração sem ácido acético demonstrou melhores resultados. As figuras 10 e 11 apresentam os cromatogramas obtidos para a extração do clorfenvinfos e do malatião, respectivamente, para uma amostra fortificada da amêndoa, com e sem a adição de ácido acético. Os melhores resultados de recuperação foram obtidos para a extração sem ácido acético, com 99% de recuperação para o clorfenvinfos e 88% para o malatião, enquanto que, com a adição de ácido apenas se recuperaram 66% e 57% para o clorfenvinfos e para o malatião, respectivamente. Uma vez que as amostras foram extraídas e injetadas no próprio dia, não houve a necessidade de se obterem extratos mais estáveis a pH mais baixos, portanto, a adição de ácido acético pode ser evitada. Esta etapa tem maior importância quando se trata de um espaço de tempo mais longo entre a extração e a injeção, de forma a evitar a degradação dos pesticidas ao longo do tempo. Por outro lado, o uso de um meio tamponando não é indicado para certas matrizes com elevado teor de lípidos, uma vez que reduz a capacidade de retenção do PSA a pH mais baixos, resultando assim numa maior quantidade de coextrativos (Socas-Rodríguez et al. 2017).

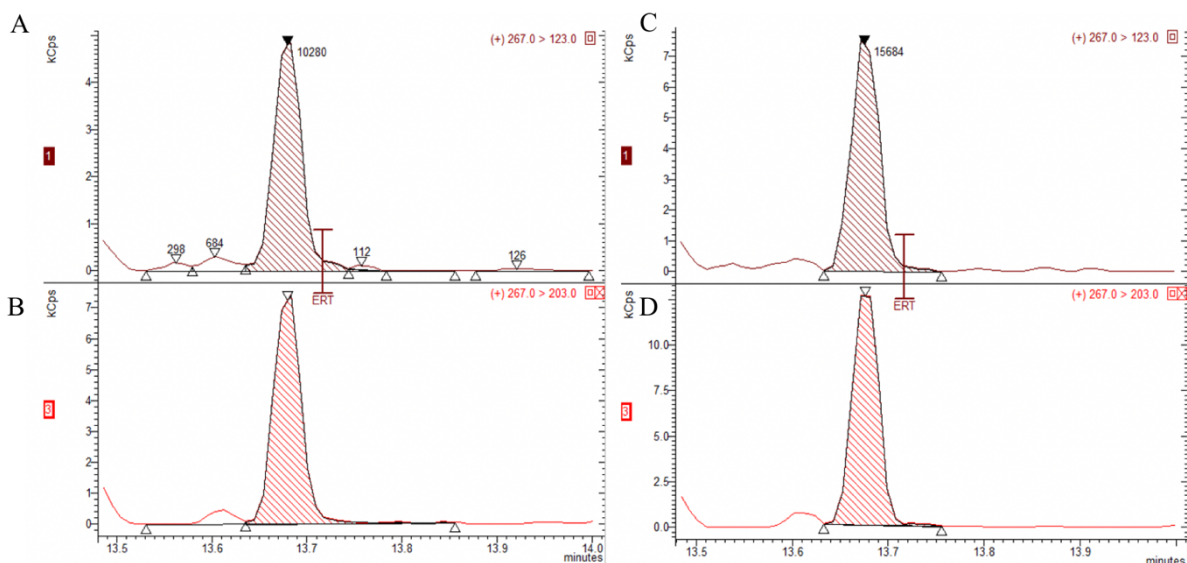


Figura 10 - Representação gráfica dos cromatogramas obtidos por GC-MS/MS da análise do clorfeniramina extraído da amêndoa, com a adição de ácido acético (A e B) e sem a adição de ácido acético (C e D). A e C representam os picos dos íons quantitadores e B e D representam os picos referentes aos íons qualificadores.

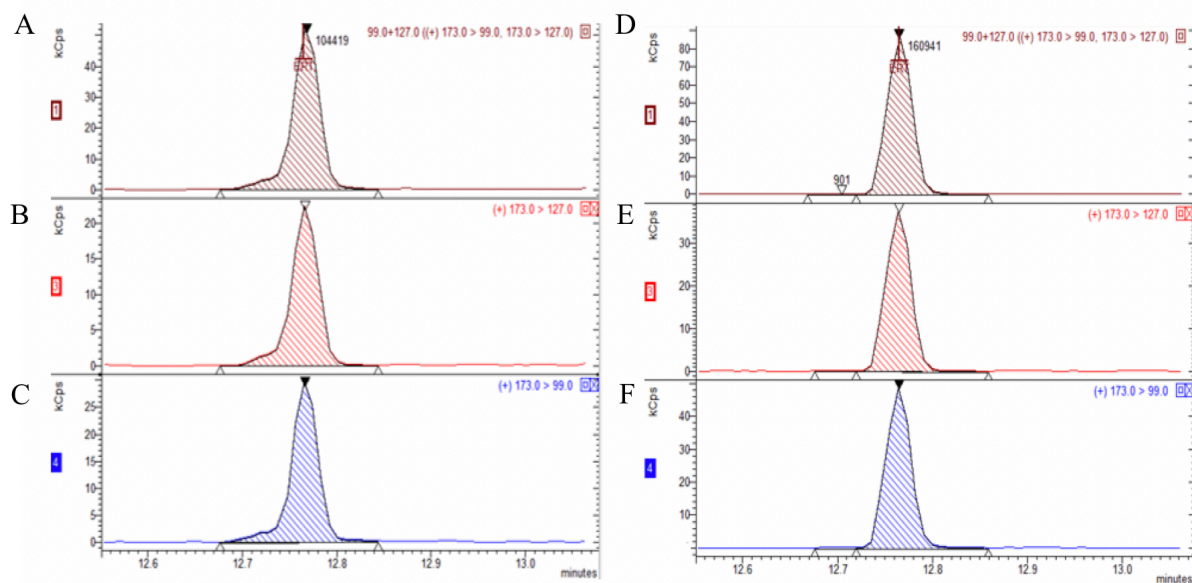


Figura 11 - Representação gráfica dos cromatogramas obtidos por GC-MS/MS da análise do malathion extraído da amêndoa, com a adição de ácido acético (A, B e C) e sem a adição de ácido acético (D, E e F). A e D representam os picos dos íons quantitadores e B, C, E e F representam os picos referentes aos íons qualificadores.

Relativamente à etapa de *salting-out* e à fase de limpeza d-SPE, não se efetuou nenhum estudo em relação aos melhores sais e adsorventes a utilizar, visto o laboratório da SGS Portugal utilizar Kits de extração QuEChERS já definidos (kit para *salting-out* composto por sulfato de magnésio, cloreto de sódio, citrato de sódio desidratado básico e citrato de sódio desidratado tribásico, como referido no na secção 2.1).

O uso de sais após a adição do solvente de extração ajuda a induzir a separação de fases acetonitrilo/água e influencia a percentagem de água na fase orgânica. O $MgSO_4$ contribui para eliminar os restos de água da fase do acetonitrilo e para a coextração de alguns compostos polares indesejáveis da matriz da amostra, como por exemplo açúcares. Enquanto que o $NaCl$ ajuda a controlar a polaridade dos solventes e, desta forma, aumenta a seletividade da extração (Rejczak et al. 2015).

No que se refere ao uso de citratos na etapa de *salting-out*, estes podem ser vantajosos para uma extração mais eficiente, uma vez que, o uso do um meio tamponado pode evitar a degradação de compostos mais sensíveis a variações de pH. O tampão citrato apresenta uma capacidade de tampão relativamente baixa em comparação ao tampão acetato que apresenta uma capacidade de tampão mais forte (Perestrelo et al. 2019). Portanto, neste caso, o uso de citrato de sódio desidratado básico e citrato de sódio desidratado tribásico foi mais indicado para o tipo de matriz em estudo, uma vez que, como já referido em cima, para certas matrizes com elevado teor de lípidos, o uso de um meio tamponado forte pode levar à redução da capacidade de retenção do PSA e assim, a uma maior quantidade de coextrativos.

Para a etapa de limpeza d-SPE, tal como mencionado na secção 2.1., utilizou-se um kit QuEChERS composto por PSA, C_{18} e $MgSO_4$. Esta etapa é fundamental para uma melhor extração, uma vez que envolve uma limpeza adicional, após a etapa de *salting out*, que permite remover interferentes da matriz. O PSA é eficaz para remover ácidos gordos, açúcares, ácidos orgânicos, lípidos e alguns pigmentos, enquanto, o C_{18} ajuda a remover as interferências apolares, como lípidos e gorduras. Quanto ao $MgSO_4$, este absorve as moléculas de água que restam na fase orgânica após a etapa de *salting out*, permitindo uma limpeza ainda mais eficiente (Lawal et al. 2018). A seleção, a combinação e a quantidade correta dos sais e adsorventes na etapa de limpeza d-SPE é crucial para melhorar a deteção de resíduos de pesticidas presentes nos extratos de matrizes complexas, sem efeitos adversos nas suas respostas.

3.2. VALIDAÇÃO

Qualquer método analítico tem como principal propósito o fornecimento de dados consistentes, verdadeiros e precisos, com uma incerteza conhecida. Portanto, a validação de um método desempenha um papel muito importante para que esse objetivo seja atingido.

A validação do método desenvolvido neste trabalho foi realizada tendo como base os critérios do SANTE/11312/2021. Foram avaliados parâmetros como a linearidade e gama de trabalho; a especificidade e seletividade; os limiares analíticos: LD e LQ; a precisão: repetibilidade e precisão intermédia; a exatidão através de ensaios recuperação; o controle de duplicados; e, por último, a incerteza: incerteza da precisão, incerteza da veracidade, incerteza combinada e incerteza expandida. O método foi validado para dois pesticidas, o clorfenvinfos e o malatião, e para duas matrizes representativas do grupo 4^a do SANTE/11312/2021, a amêndoa e o amendoim.

3.2.1. Gama de Trabalho

O LMR com o valor mais baixo para pesticidas estipulado na União Europeia corresponde a 0,01 mg/kg (“European Commission - EU Pesticides Database” 2023), ou seja, a 10 ppb. Portanto, para este trabalho experimental, escolheu-se como limite inferior da gama de trabalho um valor abaixo deste, 5 ppb. Para definir o limite superior, teve-se em consideração as orientações descritas no SANTE/11312/2021, e, portanto, o limite superior da gama de trabalho foi definido como 20 vezes o limite inferior da gama, 100 ppb.

Para o clorfenvinfos, o LMR estabelecido pela União Europeia para as matrizes amêndoa e amendoim é de 0,02 mg/kg, de acordo com o regulamento (UE) 1138/2013 (de 8 de novembro de 2013), (Comissão Europeia 2013). No caso do malatião, o LMR estabelecido pela União Europeia para as matrizes em estudo é também de 0,02 mg/kg, tendo em conta o regulamento (UE) 2015/399 (de 25 de fevereiro de 2015), (Comissão Europeia 2015). Portanto, ao definir uma gama de trabalho de 5 a 100 ppb assegura-se que o LMR se encontra dentro desse intervalo.

Para a análise da gama de trabalho recorreu-se ao teste da homogeneidade de variâncias, no qual se analisaram dez ensaios para o primeiro e último padrão da reta de calibração e se compararam as variâncias associadas a cada um destes padrões. Os resultados obtidos para a realização deste estudo encontram-se resumidos na tabela 7. No **Apêndice B** apresentam-se, com maior detalhe, os resultados do teste da homogeneidade de variâncias. Comparando o valor de PG obtido com o valor tabelado da distribuição de F de Snedecor / Fisher, verifica-se $PG < F$ para ambos os pesticidas em ambas as matrizes, concluindo-se que as diferenças de variâncias não são significativas e, portanto, que a gama de trabalho está bem ajustada.

Tabela 7 - Resultados obtidos para o teste da homogeneidade de variâncias.

Teste da Homogeneidade de Variâncias							
Pesticida	Matriz	Padrão	Concentração esperada (ppb)	Concentração Média 10 ensaios (ppb)	S ²	PG	F
Clorfenvinfos	Amêndoa	1	5	5,32	0,82	4,10	5,35
		6	100	102	3,37		
	Amendoim	1	5	4,83	0,85	4,14	
		6	100	101	3,52		
Malatião	Amêndoa	1	5	5,05	0,60	3,88	
		6	100	104	2,34		
	Amendoim	1	5	5,09	0,68	4,74	
		6	100	101	3,21		

3.2.2. Linearidade

A linearidade foi avaliada através de uma curva de calibração do sinal do equipamento, correspondente à área do pico, em função da concentração. O estudo foi efetuado em extrato de matriz e recorrendo a seis pontos, compreendidos no intervalo de gama de trabalho estipulado (5, 10, 25, 50, 75 e 100 ppb). A figura 12 apresenta as curvas de calibração do clorfenvinfos extraído da amêndoa e do amendoim, enquanto que a figura 13 apresenta as curvas de calibração do malatião extraído da amêndoa e do amendoim.

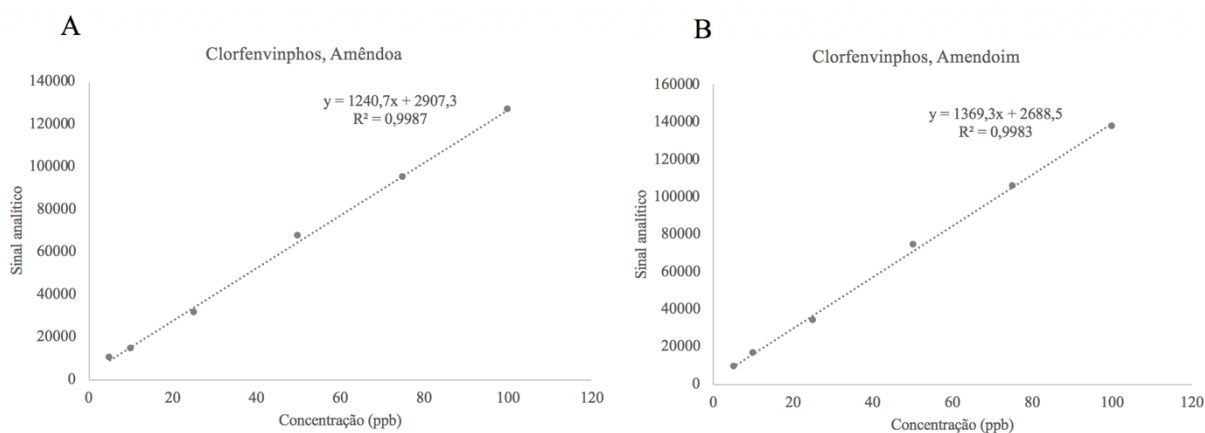


Figura 12 - Representação gráfica da reta de calibração obtida para o clorfenvinfos na amêndoa (A) e no amendoim (B).

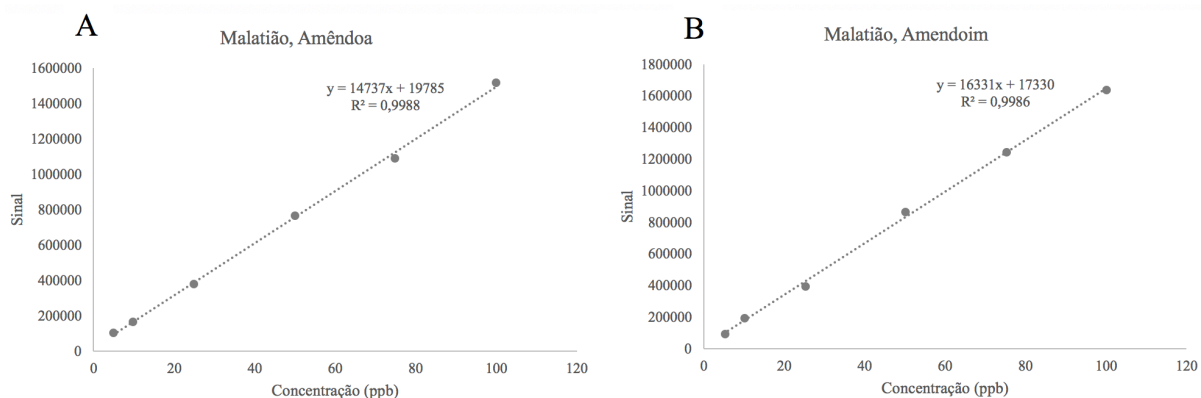


Figura 13 - Representação gráfica da reta de calibração obtida para o malatião na amêndoa (A) e no amendoim (B).

A qualidade da regressão linear foi avaliada de acordo com o coeficiente de correlação (R^2), apresentado na tabela 8 para cada pesticida e matriz em estudo. O R^2 deve estar compreendido entre -1 e +1 e ser superior a 0,995 (Guia RELACRE 13 2000). Através da análise da tabela 8 verifica-se que as retas apresentam bons coeficientes de correlação e, portanto, os critérios são cumpridos.

Tabela 8 - Resultados da equação da reta e do coeficiente de correlação obtidos para as retas de calibração.

Pesticida	Matriz	Equação da reta	R^2
Clorfenvinfos	Amêndoa	$y = 1240,7x + 2907,3$	0,99870
	Amendoim	$y = 1369,3x + 2688,5$	0,99830
Malatião	Amêndoa	$y = 14737x + 19785$	0,99880
	Amendoim	$y = 16331x + 17330$	0,99860

Para aceitar a linearidade também se aplicou o teste de *Mandel*, comparando-se as variâncias associadas a um ajuste linear e a um ajuste polinomial da curva de calibração. A tabela 9 apresenta os valores calculados para o teste de *Mandel* e os cálculos efetuados encontram-se explícitos na secção 1.10.2. No **Apêndice B** é possível consultar os dados referentes a este teste com maior detalhe. De acordo com a Guia RELACRE 13, como o valor de PG obtido para cada pesticida e cada matriz em estudo é inferior ao valor tabelado da distribuição de F de Snedecor / Fisher, então conclui-se que a função de calibração é linear e não é necessário ajustar a gama de trabalho (Guia RELACRE 13 2000).

Tabela 9 - Resultados obtidos para a realização do teste de *Mandel*.

Teste de <i>Mandel</i>								
Pesticida	Matriz	Ajuste linear		Ajuste polinomial		DS^2	PG	F
		$S_{y/x}$	$S^2_{y/x}$	S_{y^2}	$S^2_{y^2}$			
Clorfenvinfos	Amêndoa	$1,87 \times 10^3$	$3,48 \times 10^6$	$2,15 \times 10^3$	$4,61 \times 10^6$	$9,65 \times 10^4$	0,02	10,13
	Amendoim	$2,39 \times 10^3$	$5,73 \times 10^6$	$1,03 \times 10^4$	$1,07 \times 10^8$	$-2,97 \times 10^8$	-2,79	
Malatião	Amêndoa	$2,21 \times 10^4$	$4,87 \times 10^8$	$2,19 \times 10^4$	$4,81 \times 10^8$	$5,04 \times 10^8$	1,05	
	Amendoim	$2,56 \times 10^4$	$6,56 \times 10^8$	$1,29 \times 10^5$	$1,66 \times 10^{10}$	$-4,72 \times 10^{10}$	-2,84	

A análise de resíduos também foi aplicada como critério de aceitação da linearidade. De acordo o SANTE/11312/2021, o desvio entre a concentração obtida e a concentração esperada não pode ser superior a 20% (SANTE/11312/2021 2021). Nas tabelas 10, 11, 12 e 13 encontram-se as percentagens da diferença entre as concentrações experimentais e as concentrações calculadas a partir da equação da reta de calibração, para cada padrão. Como se pode verificar todos os valores do desvio percentual entre a concentração esperada e a concentração obtida são inferiores a 20%, o que permite aceitar a linearidade de acordo com o critério do SANTE/11312/2021.

Tabela 10 - Resultados obtidos para a análise de resíduos da reta de calibração para o clorfenvinfos na amêndoa.

Pesticida	Clorfenvinfos		
Matriz	Amêndoa		
Ponto da reta	Concentração esperada (ppb)	Concentração obtida (ppb)	Desvio das concentrações (%)
1	5	5,94	18,8
2	10	9,58	4,21
3	25	23,2	7,35
4	50	52,0	4,09
5	75	74,4	0,86
6	100	99,9	0,09

Tabela 11 - Resultados obtidos para a análise de resíduos da reta de calibração para o clorfenvinfos no amendoim.

Pesticida	Clorfenvinfos		
Matriz	Amendoim		
Ponto da reta	Concentração esperada (ppb)	Concentração obtida (ppb)	Desvio das concentrações (%)
1	5	4,97	0,69
2	10	10,2	1,66
3	25	23,0	8,10
4	50	52,5	5,00
5	75	75,6	0,81
6	100	98,8	1,21

Tabela 12 - Resultados obtidos para a análise de resíduos da reta de calibração para o malatião na amêndoa.

Pesticida	Malatião		
Matriz	Amêndoa		
Ponto da reta	Concentração esperada (ppb)	Concentração obtida (ppb)	Desvio das concentrações (%)
1	5	5,75	14,9
2	10	9,77	2,27
3	25	24,7	1,25
4	50	50,6	1,27
5	75	72,6	3,14
6	100	101	1,51

Tabela 13 - Resultados obtidos para a análise de resíduos da reta de calibração para o malatião no amendoim.

Pesticida	Malatião		
	Amendoim		
Matriz	Concentração esperada (ppb)	Concentração obtida (ppb)	Desvio das concentrações (%)
Ponto da reta			
1	5	4,68	6,32
2	10	10,8	8,29
3	25	23,0	8,11
4	50	52,1	4,17
5	75	75,1	0,17
6	100	99,3	0,70

3.2.3. Especificidade e Seletividade

Tendo em conta que a especificidade e a seletividade são parâmetros que traduzem a capacidade de um método identificar e distinguir o analito alvo, em cromatografia podem ser avaliadas pela capacidade do equipamento reconhecer o pico do analito entre os vários interferentes da matriz.

Neste caso, existem três fatores na análise cromatográfica que podem ser avaliados para retirar conclusões acerca da seletividade e da especificidade: a sobreposição dos picos dos iões quantificador e qualificador; o tempo de retenção (TI) e a razão iónica (RI).

A figura 14 apresenta os cromatogramas obtidos para o clorfenvinfos referentes ao padrão de calibração 6 (de concentração 100 ppb) para as matrizes amêndoa e amendoim, enquanto que a figura 15 representa os cromatogramas relativos ao pesticida malatião, também referentes ao padrão 6, para a amêndoa e para o amendoim. Analisando a figura 14, verifica-se que os picos do ião quantificador e do ião qualificador para o clorfenvinfos (transições 267>123 e 267>203, respetivamente), sobrepõem-se e, portanto, é confirmada a especificidade do método em detetar este pesticida. No caso do malatião verifica-se pela figura 15 que os picos do ião quantificador e dos iões qualificadores (transições 173>127, 173>127 e 173>99, respetivamente) sobrepõem-se, confirmando também a especificidade do método para a deteção do malatião.

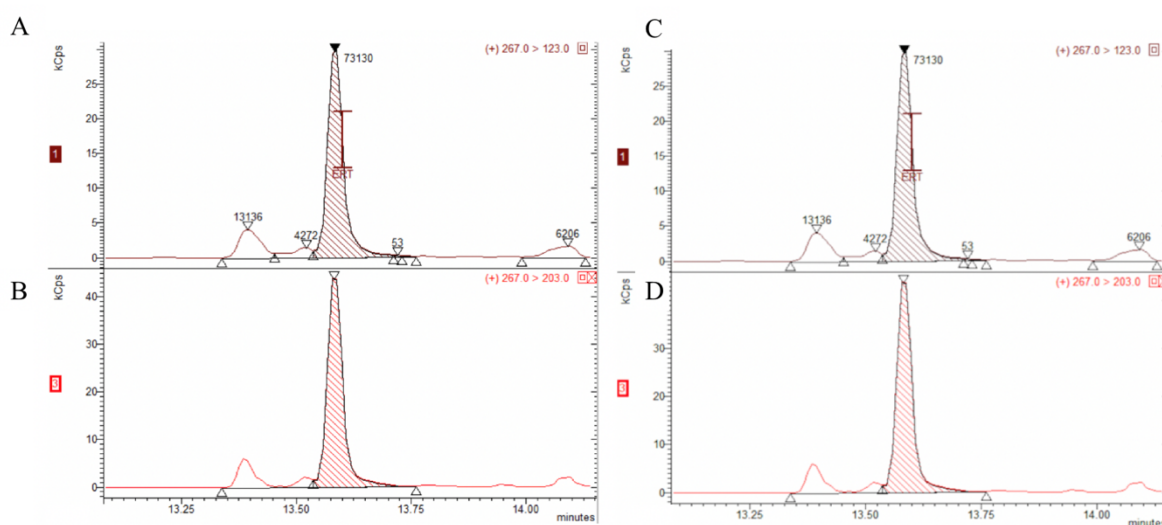


Figura 14 - Representação gráfica dos cromatogramas obtidos por GC-MS/MS para o padrão 6 na análise do clorfenvinfos extraído da amêndoa (A e B) e do amendoim (C e D). A e C representam os picos dos iões quantificadores e B e D representam os picos referentes aos iões qualificadores.

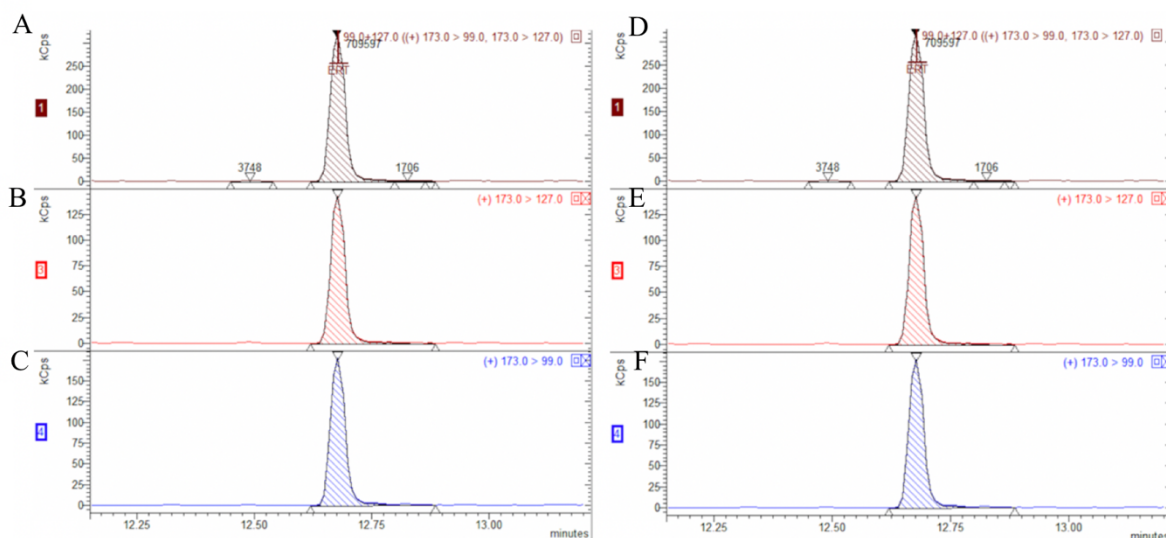


Figura 15 - Representação gráfica dos cromatogramas obtidos por GC-MS/MS para o padrão 6 na análise do clorfenvinfos extraído da amêndoa (A, B e C) e do amendoim (D, E e F). A e D representam os picos dos íons quantificadores e B, C, E e F representam os picos referentes aos íons qualificadores.

O tempo de retenção e a razão iónica foram avaliados para amostras fortificadas de cada matriz e para cada pesticida, face ao tempo de retenção médio dos padrões de calibração e à razão iónica média dos padrões de calibração. A tabela 14 apresenta os tempos de retenção e as razões iónicas médios dos padrões de calibração, assim como os tempos de retenção e as razões iónicas de uma amostra fortificada, referentes a um ensaio exemplificativo. De acordo com o SANTE/11312/2021, o tempo de retenção do analito não se deve desviar mais do que 0,1 do valor de referência e, o desvio da razão iónica não deve exceder os 30% (SANTE/11312/2021 2021). Analisando os dados da tabela 14 conclui-se que ambos os critérios são cumpridos e, portanto, verifica-se a capacidade de o método detetar e distinguir os analitos, comprovando-se ser um método específico e seletivo.

Tabela 14 - Resultados obtidos dos tempos de retenção e razões iónicas para os padrões e para a amostra fortificada.

Pesticida	Matriz	TR dos padrões	TR da amostra fortificada	RI 1 dos padrões	RI 1 da amostra fortificada	RI 2 dos padrões	RI 2 da amostra fortificada
Clorfenvinfos	Amêndoa	13,557	13,558	157,5%	145,7%		
	Amendoim	13,555	13,548	162,9%	166,4%		
Malatião	Amêndoa	12,650	12,650	45,12%	45,30%	55,10%	54,70%
	Amendoim	12,645	12,643	46,03%	45,70%	54,92%	54,50%

3.2.4. Limiares Analíticos

De acordo com a Guia RELACRE 13, o limite de deteção (LD) e o limite de quantificação (LQ), na teoria, são calculados através do desvio padrão da curva de calibração e do declive da mesma, como explicado na secção 1.1.3. (Guia RELACRE 13 2000). Na tabela 15 encontram-se os valores obtidos nestas condições para cada pesticida e para cada matriz em estudo. É importante ter em conta que os valores finais do LD e do LQ foram multiplicados pelo fator do método e convertidos de ppb (unidades retiradas do equipamento) para mg/kg, uma vez que na SGS Portugal o valor final é comunicado ao cliente em mg/kg. O fator do método corresponde à razão entre o volume de solvente utilizado na extração e a massa de amostra, sendo, neste caso, igual a 0,74.

Tabela 15 - Valores de LD e de LQ obtidos na validação do método.

Pesticida	Matriz	Equação da reta	Declive	$S_{y/x}$	LD (mg/kg)	LQ (mg/kg)
Clorfenvinfos	Amêndoa	$y = 1240,7x + 2907,3$	$1,24 \times 10^3$	$1,87 \times 10^3$	0,00368	0,0111
	Amendoim	$y = 1369,3x + 2688,5$	$1,37 \times 10^3$	$2,39 \times 10^3$	0,00427	0,0129
Malatião	Amêndoa	$y = 14737x + 19785$	$1,47 \times 10^4$	$2,21 \times 10^4$	0,00366	0,0111
	Amendoim	$y = 16331x + 17330$	$1,63 \times 10^4$	$2,55 \times 10^4$	0,00382	0,0116

No entanto, o valor do LQ obtido pelo desvio padrão e pelo declive da reta de calibração, não reflete a realidade experimental, pelo que, deve ser feita uma confirmação experimental deste valor através de ensaios de recuperação. O SANTE/11312/2021 postula que, um valor aceitável de LQ é conseguido quando os valores de recuperação se encontram no intervalo de 70-120% com um coeficiente de variação (CV) $\leq 20\%$ (SANTE/11312/2021 2021). Deste modo, o LQ representa o nível de concentração mais baixo da validação que atende a estes critérios de aceitabilidade de desempenho do método.

Na tabela 16 apresentam-se os valores de recuperação média correspondente a vários ensaios, para uma concentração esperada no equipamento de 13,5 ppb (correspondente a um resultado final de 0,01 mg/kg), bem como o CV associado. No **Apêndice B** é possível consultar, com maior detalhe os valores de recuperação obtidos para cada ensaio.

Tabela 16 - Valores médios de concentração obtidos para amostras fortificadas e respetivas recuperações.

Pesticida	Matriz	Concentração média das amostras fortificadas (ppb)	Concentração média das amostras fortificadas (mg/kg)	Recuperação média (%)	CV (%)
Clorfenvinfos	Amêndoa	11,80	0,008732	87,43	11,86
	Amendoim	12,28	0,009087	90,98	12,10
Malatião	Amêndoa	11,73	0,008680	86,89	9,230
	Amendoim	11,49	0,008503	85,08	11,87

Atendendo às boas taxas de recuperação obtidas ao longo dos ensaios e ao valor de CV obtido para a média das recuperações, verifica-se que são cumpridos ambos os critérios definidos pelo SANTE/11312/2021. Desta forma, pode-se considerar que o método desenvolvido apresenta um LQ experimental de 0,01 mg/kg. Dado este valor ser inferior ao LMR estabelecido para ambos os pesticidas e ambas as matrizes em estudo (0,02 mg/kg), conclui-se que o método desenvolvido é capaz de detetar e quantificar o analito alvo, com clareza, a concentrações inferiores ao LMR.

3.2.5. Precisão

Neste trabalho, a precisão foi avaliada através de duas medidas: repetibilidade e precisão intermédia, recorrendo a ensaios de recuperação.

Repetibilidade

Este parâmetro foi avaliado sob condições específicas de repetibilidade. Neste caso, a análise foi realizada no mesmo laboratório, pelo mesmo analista, sem variar o procedimento e utilizando os mesmos equipamentos e reagentes, num único dia e na mesma corrida do GC-MS/MS. Desta forma,

efetuaram-se dez medições de uma amostra fortificada com 13,5 ppb para a amêndoa e para o amendoim. Nas tabelas 17, 18, 19 e 20 apresentam-se os resultados obtidos neste estudo para cada pesticida e matriz.

Tabela 17 - Resultados obtidos para a repetibilidade na validação do clorfenvinfos na amêndoa.

Pesticida	Clorfenvinfos					
Matriz	Amêndoa					
Ensaio	Concentração (ppb)	Concentração média (ppb)	S_r	r	r (%)	CV (%)
1	11,26	11,38	1,23	3,46	30,37	10,85
2	12,72					
3	13,16					
4	11,60					
5	10,37					
6	10,05					
7	12,55					
8	10,54					
9	11,98					
10	9,520					

Tabela 18 - Resultados obtidos para a repetibilidade na validação do clorfenvinfos no amendoim.

Pesticida	Clorfenvinfos					
Matriz	Amendoim					
Ensaio	Concentração (ppb)	Concentração média (ppb)	S_r	r	r (%)	CV (%)
1	11,20	11,64	0,55	1,55	13,29	4,74
2	11,77					
3	12,27					
4	10,68					
5	11,74					
6	12,34					
7	12,04					
8	11,98					
9	11,06					
10	11,34					

Tabela 19 - Resultados obtidos para a repetibilidade na validação do malatião na amêndoa.

Pesticida	Malatião					
Matriz	Amêndoa					
Ensaio	Concentração (ppb)	Concentração média (ppb)	S_r	r	r (%)	CV (%)
1	10,91	10,62	0,84	2,35	22,10	7,89
2	10,98					
3	11,41					
4	11,62					
5	11,65					
6	9,08					
7	10,46					
8	9,94					
9	10,18					
10	10,01					

Tabela 20 - Resultados obtidos para a repetibilidade na validação do malatião no amendoim.

Pesticida	Malatião					
Matriz	Amendoim					
Ensaio	Concentração (ppb)	Concentração média (ppb)	S_r	r	r (%)	CV (%)
1	9,97	10,60	0,37	1,04	9,79	3,50
2	11,05					
3	11,26					
4	10,60					
5	10,53					
6	10,23					
7	10,49					
8	10,70					
9	10,73					
10	10,45					

De acordo com os critérios do SANTE/11312/2021, para aceitar a repetibilidade, o coeficiente de variação de repetibilidade não deve ser superior a 20% (SANTE/11312/2021 2021). Como verificado nas tabelas anteriores, conseguiram-se valores de CV de 10,85%, 4,74%, 7,89% e 3,50%, portanto, obtiveram-se resultados precisos no método desenvolvido.

Precisão Intermédia

Ao contrário da repetibilidade, para avaliar a precisão intermédia é necessário variar uma ou mais condições da análise. Neste trabalho, manteve-se constante o laboratório, o analista, o procedimento e os equipamentos e reagentes, fazendo-se variar apenas o dia da análise. A precisão intermédia para o clorfenvinfos e o malatião, foi avaliada num período de cinco meses, efetuando-se vários ensaios de fortificação de 13,5 ppb para a amêndoa e para o amendoim. Nas tabelas 21, 22, 23 e 24 encontram-se os valores de concentração obtidos para esta análise, bem como o desvio padrão associado, o limite de precisão intermédia e o coeficiente de variação da precisão intermédia.

Tabela 21 - Resultados obtidos para a precisão intermédia na validação do clorfenvinfos na amêndoa.

Pesticida	Clorfenvinfos					
Matriz	Amêndoa					
Data	Concentração (ppb)	Concentração média (ppb)	S_i	r_i	r_i(%)	CV (%)
02/11/2022	13,38	11,56	1,31	3,65	31,59	11,28
08/11/2022	9,80					
06/12/2022	11,33					
05/01/2023	12,38					
11/01/2023	10,73					
14/02/2023	12,75					
01/03/2023	10,58					

Tabela 22 - Resultados obtidos para a precisão intermédia na validação do clorfenvinfos no amendoim.

Pesticida	Clorfenvinfos					
Matriz	Amendoim					
Data	Concentração (ppb)	Concentração média (ppb)	S_i	r_i	r_i(%)	CV (%)
14/11/2022	12,08	12,58	1,33	3,71	29,50	10,54
06/12/2022	13,99					
05/01/2023	10,08					
11/01/2023	12,19					
19/01/2023	12,72					
14/02/2023	13,17					
01/03/2023	13,81					

Tabela 23 - Resultados obtidos para a precisão intermédia na validação do malatião na amêndoa.

Pesticida	Malatião					
Matriz	Amêndoa					
Data	Concentração (ppb)	Concentração média (ppb)	S_i	r_i	r_i(%)	CV (%)
02/11/2022	11,92	11,53	1,05	2,93	25,39	9,07
08/11/2022	11,65					
06/12/2022	12,51					
05/01/2023	12,47					
11/01/2023	10,84					
01/03/2023	9,81					

Tabela 24 - Resultados obtidos para a precisão intermédia na validação do malatião no amendoim.

Pesticida	Malatião					
Matriz	Amendoim					
Data	Concentração (ppb)	Concentração média (ppb)	S_i	r_i	r_i(%)	CV (%)
14/11/2022	11,87	11,96	1,35	3,77	31,52	11,26
06/12/2022	12,78					
05/01/2023	10,87					
11/01/2023	9,55					
19/01/2023	12,78					
14/02/2023	12,40					
01/03/2023	13,49					

Para fins de validação e de acordo com o SANTE/11312/2021, a precisão intermédia é aceite quando o coeficiente de precisão intermédia é inferior a 20% (SANTE/11312/2021 2021). Como se verifica nas tabelas anteriores, conseguiram-se valores de CV de 11,28%, 10,54%, 9,07% e 11,26%, concluindo-se que o método permite obter resultados precisos, em condições de precisão intermédia, ou seja, num elevado período de tempo.

3.2.6. Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através de amostras fortificadas, efetuando-se vários ensaios de recuperação. Conforme o SANTE/11312/2021, para avaliar a recuperação é necessário um mínimo de cinco réplicas ao nível do LQ, e pelo menos um outro nível superior ao LQ (SANTE/11312/2021 2021). Como critério de aceitação, os valores de recuperação devem estar compreendidos entre 70-120%, com um coeficiente de variação associado inferior a 20%.

A fim de determinar a exatidão neste trabalho, fortificaram-se amostras ao nível do LQ (13,5 ppb), a um nível duas vezes superior ao LQ (27,0 ppb) e a um nível cinco vezes superior ao LQ (67,5 ppb). Os resultados de recuperação obtidos para o clorfenvinfos apresentam-se nas tabelas 25 e 26 para a amêndoa e para o amendoim, respetivamente, enquanto que os resultados para o malatião encontram-se nas tabelas 27 e 28 para a amêndoa e para o amendoim, respetivamente.

Tabela 25 - Resultados obtidos para avaliar a exatidão na validação do clorfenvinfos na amêndoa.

Pesticida	Clorfenvinfos					
Matriz	Amêndoa					
Data	Concentração teórica (ppb)	Concentração obtida (ppb)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	Desvio padrão	CV (%)
02/11/22	13,5	13,38	99,14	87,05	11,03	12,7
08/11/22	13,5	9,80	72,59			
	67,5	56,29	83,39			
		51,49	76,28			
06/12/22	13,5	11,33	83,90			
		12,13	89,85			
05/01/23	13,5	12,38	91,71			
		14,28	105,7			
		11,81	87,47			
		27,0	29,58			
11/01/23	13,5	10,73	79,47			
		11,19	82,87			
	27,0	23,09	85,51			
		24,61	91,14			
19/01/23	27,0	19,30	71,49			
14/02/23	13,5	12,75	94,44			
		13,31	98,55			
01/03/23	13,5	10,58	78,38			
		9,79	72,49			

Tabela 26 - Resultados obtidos para avaliar a exatidão na validação do clorfenvinfos no amendoim.

Pesticida	Clorfenvinfos					
Matriz	Amendoim					
Data	Concentração teórica (ppb)	Concentração obtida (ppb)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	Desvio padrão	CV (%)
14/11/22	13,5	12,08	89,49	90,36	11,80	13,1
	67,5	57,27	84,84			
		63,53	94,11			
06/12/22	13,5	13,99	103,7			
		11,81	87,50			
		14,88	110,2			
	27,0	28,37	105,1			
05/01/23	13,5	10,08	74,65			
		10,56	78,22			
		12,92	95,69			
		27,0	29,54			
11/01/23	13,5	12,19	90,30			
		11,48	85,01			
		10,18	75,42			
	27,0	20,47	75,80			
		19,59	72,54			
19/01/23	13,5	12,72	94,19			
		10,54	78,04			
		14,46	107,1			
		27,0	21,66	80,22		
14/02/23	13,5	13,17	97,53			
		12,63	93,54			
		11,33	83,90			
01/03/23	13,5	13,81	102,3			

Tabela 27 - Resultados obtidos para avaliar a exatidão na validação do malatião na amêndoa.

Pesticida	Malatião					
Matriz	Amêndoa					
Data	Concentração teórica (ppb)	Concentração obtida (ppb)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	Desvio padrão	CV (%)
02/11/22	13,5	11,92	88,30	83,95	10,04	12,0
08/11/22	13,5	11,65	86,32			
	67,5	52,66	78,01			
		51,00	75,56			
06/12/22	13,5	12,51	92,64			
		12,57	93,09			
05/01/23	13,5	12,47	92,37			
		13,47	99,75			
		11,33	83,96			
	27,0	19,16	70,97			
		28,35	105,0			
11/01/23	13,5	10,84	80,26			
		10,74	79,58			
	27,0	20,32	75,25			
		22,09	81,80			
19/01/23	27,0	19,35	71,68			
01/03/23	13,5	9,80	72,62			

Tabela 28 - Resultados obtidos para avaliar a exatidão na validação do malatião no amendoim.

Pesticida	Malatião					
Matriz	Amendoim					
Data	Concentração teórica (ppb)	Concentração obtida (ppb)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	Desvio padrão	CV (%)
14/11/22	13,5	11,87	87,93	87,23	12,07	13,8
	67,5	57,21	84,75			
		63,84	94,58			
06/12/22	13,5	12,78	94,69			
		12,73	94,27			
		13,03	96,52			
	27,0	28,25	104,6			
05/01/23	13,5	10,87	80,50			
		9,99	74,01			
		9,67	71,60			
	27,0	19,19	71,07			
		31,14	115,3			
11/01/23	13,5	9,55	70,77			
19/01/23	13,5	12,78	94,67			
		11,40	84,44			
		11,40	84,44			
	27,0	22,97	85,09			
14/02/23	13,5	12,40	91,84			
		9,63	71,33			
		10,71	79,35			
01/03/23	13,5	13,49	99,94			

Através da análise das tabelas 25, 26, 27 e 28 verifica-se que foram obtidos valores de recuperação média de 87,05% para a análise do clorfenvinfos na amêndoa e 90,36% no amendoim. Já para o malatião conseguiram-se recuperações médias de 83,95% e 87,23% para a amêndoa e para o amendoim, respetivamente. É de notar também que todos os ensaios apresentados para os dois pesticidas e as duas matrizes em estudo apresentam valores de recuperação no intervalo de 70-120%, tendo-se conseguido uma média de 20 ensaios por estudo, o que revela que o método desenvolvido permitiu obter recuperações aceitáveis dentro dos critérios definidos, demonstrando-se ser um método exato.

3.2.7. Controlo de Duplicados

A análise de duplicados foi realizada em condições de repetibilidade, efetuando-se duas réplicas da amostra recuperada no mesmo dia e, em condições de precisão intermédia, uma vez que se repetiram os ensaios de duplicados em quatro dias num período superior a 2 meses. As tabelas 29 e 30 apresentam os valores obtidos no controlo de duplicados para o clorfenvinfos na amêndoa e no amendoim, respetivamente, enquanto que as tabelas 31 e 32 apresentam a análise de duplicados para o malatião nas matrizes amêndoa e amendoim, respetivamente.

Tabela 29 - Resultados obtidos para a análise de duplicados na validação do clorfenvinfos na amêndoa.

Pesticida	Clorfenvinfos					
Matriz	Amêndoa					
Data	Concentração da amostra fortificada (ppb)	Concentração da amostra duplicada (ppb)	Média das concentrações (ppb)	Amplitude absoluta	Amplitude relativa (%)	r (%)
05/01/23	12,38	11,81	12,10	0,57	4,73	30,37
11/01/23	10,73	11,19	10,96	0,46	4,19	
14/02/23	12,75	13,30	13,03	0,56	4,26	
01/03/23	10,58	9,79	10,18	0,80	7,81	

Tabela 30 - Resultados obtidos para a análise de duplicados na validação do clorfenvinfos no amendoim.

Pesticida	Clorfenvinfos					
Matriz	Amendoim					
Data	Concentração da amostra fortificada (ppb)	Concentração da amostra duplicada (ppb)	Média das concentrações (ppb)	Amplitude absoluta	Amplitude relativa (%)	r (%)
06/12/22	13,99	14,88	14,44	0,88	6,12	13,29
05/01/23	10,08	10,56	10,32	0,48	4,67	
11/01/23	12,19	11,48	11,83	0,72	6,04	
14/02/23	13,17	12,63	12,90	0,54	4,18	

Tabela 31 - Resultados obtidos para a análise de duplicados na validação do malatião na amêndoa.

Pesticida	Malatião					
Matriz	Amêndoa					
Data	Concentração da amostra fortificada (ppb)	Concentração da amostra duplicada (ppb)	Média das concentrações (ppb)	Amplitude absoluta	Amplitude relativa (%)	r (%)
06/12/22	12,51	12,57	12,54	0,06	0,49	22,10
05/01/23	12,47	13,47	12,97	1,00	7,68	
05/01/23	12,47	11,33	11,90	1,14	9,54	
11/01/23	10,84	10,74	10,79	0,09	0,85	

Tabela 32 - Resultados obtidos para a análise de duplicados na validação do malatião no amendoim.

Pesticida	Malatião					
Matriz	Amendoim					
Data	Concentração da amostra fortificada (ppb)	Concentração da amostra duplicada (ppb)	Média das concentrações (ppb)	Amplitude absoluta	Amplitude relativa (%)	r (%)
06/12/22	12,78	12,73	12,76	0,06	0,44	9,79
06/12/22	12,78	13,03	12,91	0,25	1,91	
05/01/23	10,87	9,99	10,43	0,88	8,39	
05/01/23	10,87	9,99	10,43	0,88	8,39	

A análise de duplicados no mesmo dia está relacionada com a repetibilidade, uma vez que a extração e a análise decorrem em condições de repetibilidade. Portanto, estabeleceu-se um critério de aceitação de 20% para a amplitude relativa no controlo de duplicados, dado ser este o critério definido no SANTE/11312/2021 para a repetibilidade do método (SANTE/11312/2021 2021).

Ao analisar as tabelas anteriores verifica-se que em cada ensaio de duplicados efetuado obteve-se sempre uma amplitude relativa < 20%. Por outro lado, ao comparar os valores da amplitude relativa obtidos com os valores da repetibilidade relativa apresentados na secção 3.2.5. conclui-se que, a amplitude relativa é sempre inferior à repetibilidade relativa. Deste modo, pode-se concluir que o método permite alcançar resultados concordantes e precisos em condições de repetibilidade.

3.2.8. Incerteza

Para a validação deste método a incerteza foi calculada em termos de precisão, de forma a avaliar os erros aleatórios, e em termos de exatidão (ou veracidade), para avaliar os erros sistemáticos. Também foi calculada a incerteza combinada, tendo em consideração a incerteza da precisão e da veracidade. Por último, calculou-se a incerteza expandida através da incerteza combinada. Os cálculos utilizados para a determinação das incertezas apresentam-se na secção 1.10.6. A tabela 33 apresenta os valores obtidos de cada componente da incerteza, para cada pesticida e matriz.

Tabela 33 - Valores obtidos para a estimativa da incerteza do método.

Pesticida	Matriz	u_{precisão} (%)	u_{veracidade} (%)	u_{combinada} (%)	U (%)
Clorfenvinfos	Amêndoa	11,28	2,88	11,64	23,29
	Amendoim	10,54	2,67	10,87	21,74
Malatião	Amêndoa	9,07	2,54	9,42	18,83
	Amendoim	11,26	2,61	11,55	23,11

De acordo com os critérios do SANTE/11312/202, a incerteza expandida (U) do método deve ser inferior a 50% (SANTE/11312/2021 2021). Para a validação deste método, no caso do clorfenvinfos obteve-se uma incerteza de 23,29% para a amêndoa e 21,74% para o amendoim, e, no caso do malatião, conseguiram-se incertezas de 18,83% e de 23,11% para a amêndoa e para o amendoim, respetivamente. Portanto, conclui-se que a incerteza do método varia entre 18,83% e 23,29%, cumprindo o critério de aceitação definido.

3.3. APLICAÇÃO À ANÁLISE DE ROTINA

Para verificar a aplicabilidade do método validado na análise de rotina, analisaram-se amostras reais enviadas por clientes da SGS Portugal para análise de pesticidas. A análise foi efetuada em oito amostras de amêndoas, mas é importante referir que poderia ser para qualquer outra matriz pertencente ao grupo 4a do SANTE/11312/202 (elevado teor de gordura e baixo teor de água), uma vez que o método de extração do Clorfenvinfos e do Malatião foi validado para este grupo.

Na tabela 34 encontram-se as equações da reta de calibração e os coeficientes de correlação obtidos para este ensaio de rotina. É importante ter em conta que a reta de calibração deve ser efetuada diariamente sempre que se realizam análises de rotina. As soluções padrão da reta foram preparadas em matriz limpa de amêndoa e no próprio dia da análise das amostras. É possível verificar que ambas as retas respeitam o critério de aceitação da linearidade de $R^2 > 0,995$, tendo-se obtido um R^2 de 0,9981 para o clorfenvinfos e de 0,9995 para o malatião.

Tabela 34 - Equações das retas de calibração e coeficientes de correlação obtidos para a análise de amostras de rotina.

Data	Pesticida	Matriz	Equação da reta	R^2
18/05/2023	Clorfenvinfos	Amêndoa	$y = 2242,8x + 2163,1$	0,9981
	Malatião	Amêndoa	$y = 26727x - 17509$	0,9995

Em análises de rotina deve-se analisar uma amostra fortificada por matriz. Neste caso, como apenas se analisaram amêndoas, fortificou-se uma das amostras ao nível do LQ. Tendo em conta o SANTE/11312/2021, em análises individuais de rotina aceitam-se recuperações no intervalo de 60-140% (SANTE/11312/2021 2021). Nas tabelas 35 e 36 apresentam-se os resultados obtidos da concentração de clorfenvinfos e de malatião para cada amostra de amêndoa analisada, assim como a percentagem de recuperação. Verifica-se que a recuperação foi de 75,78% e de 71,90% para o clorfenvinfos e para o malatião, respetivamente, concluindo que o método desenvolvido tem uma boa aplicabilidade, permitindo obter boas recuperações de acordo com o critério estipulado.

Por outro lado, verifica-se que em todas as amostras, a concentração de analito obtida foi $< LQ$, confirmando-se que não houve nenhuma amostra com uma concentração de clorfenvinfos ou de malatião superior ao LMR estabelecido pela Comissão Europeia, para ambos os pesticidas na amêndoa (0,02 mg/kg). Estes resultados revelam que os limites legais estipulados estão a ser cumpridos, pelo menos por estes clientes da SGS Portugal. Também é de valorizar a atual preocupação por parte destes clientes e de outros, em controlar a presença de pesticidas nos produtos alimentares disponíveis no mercado.

Tabela 35 - Resultados de concentração de clorfenvinfos obtidos na análise de amostras de rotina.

Data	18/05/2023	
Pesticida	Clorfenvinfos	
Amostra	Concentração na amostra (mg/kg)	Recuperação (%)
Amêndoa	< LQ	75,78
Amêndoa	< LQ	
Amêndoa	< LQ	
Amêndoa	< LQ	
Amêndoa	< LQ	
Amêndoa	< LQ	
Amêndoa	< LQ	
Amêndoa	< LQ	

Tabela 36 - Resultados de concentração de malatião obtidos na análise de amostras de rotina.

Data	18/05/2023	
Pesticida	Malatião	
Amostra	Concentração na amostra (mg/kg)	Recuperação (%)
Amêndoa	< LQ	71,90
Amêndoa	< LQ	
Amêndoa	< LQ	
Amêndoa	< LQ	
Amêndoa	< LQ	
Amêndoa	< LQ	
Amêndoa	< LQ	
Amêndoa	< LQ	

Por fim, pode-se concluir que o método implementado pode ser aplicado a análises de rotina, permitindo quantificar eficientemente a presença do clorfenvinfos e do malatião em amostras alimentares enviadas por clientes da SGS Portugal.

3.4. PERSPETIVAS FUTURAS

Esta secção apresenta algumas sugestões de melhoria para a futura implementação do método desenvolvido no laboratório da SGS Portugal, assim como a sugestão de outros parâmetros da validação que podem ser avaliados e testados futuramente. Como referido anteriormente, no laboratório da SGS Portugal estão implementados dois métodos multiresíduo para o grupo 1 e 5 do SANTE/11312/2021. Esses métodos permitem a deteção de mais de 500 pesticidas diferentes, divididos entre a análise por GC-MS/MS e por LC-MS/MS. Neste trabalho foram validados dois pesticidas: o clorfenvinfos e o malatión, analisados por GC-MS/MS, embora a parte experimental tenha sido desenvolvida e aplicada para a análise dos 208 pesticidas utilizados na SGS Portugal em análises de rotina por GC-MS/MS.

Desta forma, com o desenvolvimento deste trabalho, existem dados experimentais da extração e análise no GC-MS/MS de 208 pesticidas diferentes. Portanto, como perspectivas futuras, um bom ponto de partida seria realizar a validação de todos os pesticidas analisados neste trabalho para as mesmas matrizes: amêndoa e amendoim, dado já existirem dados experimentais suficientes para facilitar este processo.

Por outro lado, também seria importante aplicar este método de extração à análise por LC-MS/MS e efetuar a validação para todos os pesticidas analisados no laboratório da SGS Portugal nesse equipamento. Apesar de ser um trabalho dispendioso e demorado, seria bastante útil que a empresa em questão fosse validada para a análise de mais de 500 pesticidas por GC-MS/MS e LC-MS/MS do grupo 4a do SANTE/11312/2021, uma vez que a validação permite comprovar que o método é confiável e preciso para a finalidade pretendida. Desta forma, o laboratório poderia aumentar o seu prestígio, abrangendo um maior número de métodos validados, com vista a atrair novos clientes.

Outro aspeto que deveria ser aplicado após o desenvolvimento deste trabalho, seria a realização de ensaios interlaboratoriais. Neste trabalho, a precisão foi avaliada em termos de repetibilidade e de precisão intermédia. Em condições de precisão intermédia apenas se fez variar o dia da análise, portanto, seria importante a realização de ensaios interlaboratoriais, com vista a avaliar a reprodutibilidade do método em condições diferentes: laboratório, analista e dia de análise.

Em suma, como perspectivas futuras, destaca-se a necessidade de validar o método para uma gama maior de pesticidas, tanto a nível de GC-MS/MS, como de LC-MS/MS, e a realização de ensaios interlaboratoriais, de forma a confirmar a reprodutibilidade do método, em condições distintas da precisão intermédia.

CAPÍTULO IV - CONCLUSÃO

Neste trabalho foi desenvolvido e validado um método multiresíduo de análise de pesticidas por GC-MS/MS para alimentos de elevado teor de gordura e baixo teor de água, no laboratório da SGS Portugal. Os objetivos principais, como a otimização do processo de extração e a validação do método tendo em conta as diretrizes do SANTE/11312/2021, foram cumpridos.

A extração QuEChERS d-SPE provou ser uma técnica simples e eficaz, com elevada seletividade na extração dos clorfenvinfos e do malatião. A adição de água, numa fase inicial do processo de extração, na proporção de 1:1 (m/v) de amostra:água permitiu hidratar a amostra de forma eficaz, sem afetar negativamente os resultados de recuperação. Por outro lado, o acetonitrilo sem a adição de ácido acético foi eficaz como solvente de extração. Conclui-se que o uso de um meio tamponando não é necessário nesta fase, uma vez que a injeção no equipamento é feita no próprio dia da análise, não havendo a necessidade de se obterem extratos mais estáveis a pH mais baixos. Dada a complexidade das matrizes amêndoa e amendoim, na etapa d-SPE o PSA e o C₁₈ foram imprescindíveis para a remoção de interferentes da matriz, principalmente gorduras.

Quanto à análise no GC-MS/MS, o equipamento demonstrou elevada seletividade e sensibilidade para os analitos alvo e permitiu a separação e deteção de um número considerável de pesticidas numa única análise.

Através dos resultados obtidos, verifica-se que, para a validação do método, a gama de trabalho de 5 a 100 ppb foi bem ajustada, apresentado uma boa linearidade com coeficientes de correlação superiores a 0,995. O teste de *Mandel* e a análise de residuais também permitiu confirmar a linearidade com bons resultados. O método demonstrou ser específico e seletivo na deteção do clorfenvinfos e do malatião, permitindo detetar analito a concentrações aproximadas de 0,004 mg/kg e quantificar a 0,01 mg/kg para ambos os pesticidas e ambas as matrizes.

A precisão do método foi avaliada em termos de repetibilidade e de precisão intermédia, concluindo-se que se obtiveram valores precisos, dado o coeficiente de variação de ambos os parâmetros ser inferior a 20%. A análise de duplicados também confirmou a precisão do método em condições de repetibilidade e de precisão intermédia, uma vez que se conseguiram valores de recuperação com amplitude relativa inferior a 20%.

A exatidão foi avaliada através de ensaios de recuperação, ao nível do LQ e a dois níveis superiores ao LQ, obtendo-se valores de recuperação aceitáveis no intervalo de 70 a 120%, com um coeficiente de variação associado inferior a 20%.

A incerteza do método foi avaliada em termos de precisão e de veracidade, obtendo-se uma incerteza expandida de cerca de 20% tanto para o clorfenvinfos, como para o malatião nas duas matrizes, respeitando o critério de aceitação do SANTE/11312/2021 (< 50%).

Em suma, o método desenvolvido foi validado com sucesso para todos os critérios estabelecidos, demonstrando que os ensaios realizados conduzem a resultados credíveis e apropriados às análises pretendidas.

A aplicação do método desenvolvido à análise de rotina permitiu alcançar bons resultados de linearidade ($R > 0,995$) e bons resultados de recuperação (60-140%), concluindo-se que o método pode ser aplicado em rotina com sucesso, permitindo quantificar eficientemente a presença do clorfenvinfos e do malatião em alimentos de elevado teor de gordura e baixo teor de água.

BIBLIOGRAFIA

- Abubakar, Yusuf, Habibu Tijjani, Chukwuebuka Egbuna, Charles Oluwaseun Adetunji, Smriti Kala, Toskë L. Kryeziu, and Kingsley C. Patrick-Iwuanyanwu. 2019. "Pesticides, History, and Classification." *Natural Remedies for Pest, Disease and Weed Control*, 29–42. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819304-4.00003-8>.
- Agilent. 2019. "Agilent 6400 Series Triple Quadrupole LC / MS System Concepts Guide." *Agilent Technologies* 1st: 20–21. https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/.../G3335-90135_QQQ_Concepts.pdf.
- "Agrochemicals IUPAC." 2023. http://agrochemicals.iupac.org/index.php?option=com_sobi2&sobi2Task=sobi2Details&catid=3&sobi2Id=31 (consultado a 25/01/2023).
- Alasalvar, Cesarettin, Jordi Salas Salvador, Emilio Ros, Maira Lykogianni, Eleftheria Bempelou, Filitsa Karamaouna, and Konstantinos A. Aliferis. 2021. "European Commission." *Food Chemistry*. Elsevier B.V. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126192>.
- Alcântara, Daniel B., Tatiana S.M. Fernandes, Hélio O. Nascimento, Amanda F. Lopes, Marília G.G. Menezes, Ari C.A. Lima, Tecia V. Carvalho, et al. 2019. "Diagnostic Detection Systems and QuEChERS Methods for Multiclass Pesticide Analyses in Different Types of Fruits: An Overview from the Last Decade." *Food Chemistry* 298 (December 2018): 124958. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.124958>.
- Anastassiades, Michelangelo, Steven J. Lehotay, Darinka Štajnbaher, and Frank J. Schenck. 2003. "Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and 'Dispersive Solid-Phase Extraction' For." *Journal of AOAC INTERNATIONAL* 86 (2): 412–31.
- "ASAE." 2023. <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-quimicos/pops.aspx> (consultado a 25/01/2023).
- "ATSDR." 2023. <https://wwwn.cdc.gov/TSP/PHS/PHS.aspx?phsid=930&toxid=193> (consultado a 02/02/2023).
- Barci, Paulo E.P., Larissa da S. Alves, Állisson A.S. Avellar, Lucila R. Cendon, Pimperelli J. dos Santos, Fabiane M. Stringhini, Osmar D. Prestes, and Renato Zanella. 2020. "Modified QuEChERS Method for Multiresidue Determination of Pesticides in Pecan Nuts by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry." *Food Analytical Methods* 13 (3): 793–801. <https://doi.org/10.1007/s12161-019-01696-0>.
- "Bruker." 2023. <https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/mass-spectrometry/triple-quads/evoq-gc.html> (consultado a 23/02/2023).
- Burki, Talha. 2022. "Food Security and Nutrition in the World." *The Lancet Diabetes and Endocrinology* 10 (9): 622. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(22\)00220-0](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(22)00220-0).
- Cajka, Tomas, Chris Sandy, Veronika Bachanova, Lucie Drabova, Kamila Kalachova, Jana Pulkrabova, and Jana Hajslova. 2012. "Streamlining Sample Preparation and Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Analysis of Multiple Pesticide Residues in Tea." *Analytica Chimica Acta* 743 (September): 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.06.051>.
- Cee. 2005. *Regulamento (Ce) N. 850/98*. Vol. 50.

- “ChEBI.” 2023. <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:38598> (consultado a 06/02/2023).
- “Chromatography Online.” 2023. <https://www.chromatographyonline.com/view/electron-ionization-gc-ms> (consultado a 23/02/2023).
- Comissão Europeia. 2013. *REGULAMENTO (UE) 1138/2013 DA COMISSÃO de 8 de Novembro de 2013. Jornal Oficial Da Comissão Europeia*. Vol. 11. Wiley-Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3077>.
- Comissão Europeia. 2015. *REGULAMENTO (UE) 2015/399 DA COMISSÃO de 25 de Fevereiro de 2015. Jornal Oficial Da União Europeia*. Vol. 12. Wiley-Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3735>.
- Comissão Europeia. 2020. *REGULAMENTO (UE) 2020/856 DA COMISSÃO de 9 de Junho de 2020. Jornal Oficial Da União Europeia*. [http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%](http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252F).
- Committee on Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment. 1999. “Organophosphates.” *Department of Health*, 1–97.
- “European Commission.” 2022. https://commission.europa.eu/index_en (consultado a 06/12/2022).
- “European Commission - EU Pesticides Database.” 2023. <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/start/screen/mrls/searchpr> (consultado a 11/01/2023).
- “FAO.” 2023. <https://www.fao.org/agriculture/crops/obsolete-pesticides/what-dealing/obs-pes/en/> (consultado a 27/01/2023).
- Flessel, Peter, P. J.E. Quintana, and Kim Hooper. 1993. “Genetic Toxicity of Malathion: A Review.” *Environmental and Molecular Mutagenesis* 22 (1): 7–17. <https://doi.org/10.1002/em.2850220104>.
- “Food and Agriculture Organization of the United Nations.” 2022. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/RP/visualize> (consultado a 06/12/2022).
- Fucic, Aleksandra, Radu Duca, Karen S. Galea, Tihana Maric, Kelly Garcia, Michael Bloom, Helle R. Andersen, and John Vena. 2021. “Reproductive Health Risks Associated with Occupational and Environmental Exposure to Pesticides.” *International Journal of Environmental Research and Public Health* 18 (12). <https://doi.org/10.3390/ijerph18126576>.
- González-Curbelo, M., B. Socas-Rodríguez, A. V. Herrera-Herrera, J. González-Sálamo, J. Hernández-Borges, and M. Rodríguez-Delgado. 2015. “Evolution and Applications of the QuEChERS Method.” *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 71: 169–85. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.012>.
- González-Curbelo, Miguel Ángel, Steven J. Lehotay, Javier Hernández-Borges, and Miguel Ángel Rodríguez-Delgado. 2014. “Use of Ammonium Formate in QuEChERS for High-Throughput Analysis of Pesticides in Food by Fast, Low-Pressure Gas Chromatography and Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry.” *Journal of Chromatography A* 1358: 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.06.104>.
- Guia RELACRE 13. 2000. “Validação de Métodos Internos de Ensaio Em Análise Química,” 1–60.
- Guia RELACRE 31. 2018. “Quantificação Da Incerteza de Medição Em Ensaios Químicos e Físico-Químicos,” 1–43.

- Jaga, Kushik, and Chandrabhan Dharmani. 2003. "Sources of Exposure to and Public Health Implications of Organophosphate Pesticides." *Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health* 14 (3): 171–85. <https://doi.org/10.1590/S1020-49892003000800004>.
- Jayaraj, Ravindran, Pankajshan Megha, and Puthur Sreedev. 2016. "Review Article. Organochlorine Pesticides, Their Toxic Effects on Living Organisms and Their Fate in the Environment." *Interdisciplinary Toxicology* 9 (3–4): 90–100. <https://doi.org/10.1515/intox-2016-0012>.
- Kaczyński, Piotr. 2017. "Clean-up and Matrix Effect in LC-MS/MS Analysis of Food of Plant Origin for High Polar Herbicides." *Food Chemistry* 230 (September): 524–31. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.091>.
- Kaushal Jyoti, Khatri Madhu and Arya Shailendra Kumar. 2021. "A treatise on Organophosphate pesticide pollution: Current strategies and advancements in their environmental degradation and elimination". *Ecotoxicology and Environmental Safety* 207: 111483. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111483>
- Kaushik, Poonam, and Geetanjali Kaushik. 2007. "An Assessment of Structure and Toxicity Correlation in Organochlorine Pesticides." *Journal of Hazardous Materials* 143 (1–2): 102–11. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.08.073>.
- Kıvrak, Şeyda, and Mahsur Harmandalı. 2018. "Development and Validation of Modified QuEChERS Method Coupled with GC-MS/MS for 123 Pesticide Residues in Food." *International Journal of Secondary Metabolite* 5 (2): 130–39. <https://doi.org/10.21448/ijsm.408174>.
- Kruve, Anneli, Riin Rebane, Karin Kipper, Maarja Liisa Oldekop, Hanno Evard, Koit Herodes, Pekka Raviio, and Ivo Leito. 2015a. "Tutorial Review on Validation of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Methods: Part II." *Analytica Chimica Acta*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.016>.
- Kruve, Anneli, Riin Rebane, Karin Kipper, Maarja Liisa Oldekop, Hanno Evard, Koit Herodes, Pekka Raviio, and Ivo Leito. 2015b. "Tutorial Review on Validation of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Methods: Part II." *Analytica Chimica Acta*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.016>.
- Kumar, Manish, Ajar Nath Yadav, Raghvendra Saxena, Diby Paul, and Rajesh Singh Tomar. 2011. "Biodiversity of Pesticides Degrading Microbial Communities and Their Environmental Impact." *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 31: 101883.
- Lawal, Abubakar, Richard Chee Seng Wong, Guan Huat Tan, Lukman Bola Abdulla'Uf, and Ali Mohamed Ali Alsharif. 2018. "Recent Modifications and Validation of QuEChERS-DSPE Coupled to LC-MS and GC-MS Instruments for Determination of Pesticide/Agrochemical Residues in Fruits and Vegetables: Review." *Journal of Chromatographic Science* 56 (7): 656–69. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmy032>.
- Lykogianni, Maira, Eleftheria Bempelou, Filitsa Karamaouna, and Konstantinos A. Aliferis. 2021. "Do Pesticides Promote or Hinder Sustainability in Agriculture? The Challenge of Sustainable Use of Pesticides in Modern Agriculture." *Science of the Total Environment* 795: 148625. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148625>.
- Mahdavi, Vahideh, Zohreh Garshasbi, Mahdi Moridi Farimani, Mohsen Farhadpour, and Hassan Y. Aboul-Enein. 2020. "Health Risk Assessment of Neonicotinoid Insecticide Residues in Pistachio

- Using a QuEChERS-Based Method in Combination with HPLC-UV.” *Biomedical Chromatography* 34: 4747.
- Marques, Ana Rita Santos. 2019. “Implementação e Validação de Um Método Cromatográfico Para Determinação de Cloratos e Percloratos Em Matrizes de Vegetais, Frutos e Cereais Utilizando o LC-MS/MS.”
- Narendaran, S. T., S. N. Meyyanathan, and B. Babu. 2020. “Review of Pesticide Residue Analysis in Fruits and Vegetables. Pre-Treatment, Extraction and Detection Techniques.” *Food Research International* 133 (November 2019): 109141. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109141>.
- “NCIthesaurus.” 2022. https://ncithesaurus.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns=ncit&code=C47593 (consultado a 26/12/2022).
- Oliveira, Cátia, Arminda Alves, and Luis M. Madeira. 2014. “Treatment of Water Networks (Waters and Deposits) Contaminated with Chlorfenvinphos by Oxidation with Fenton’s Reagent.” *Chemical Engineering Journal* 241: 190–99. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.12.026>.
- Orso, Débora, Manoel L. Martins, Filipe F. Donato, Tiele M. Rizzetti, Magali Kemmerich, Martha B. Adaime, and Renato Zanella. 2014. “Multiresidue Determination of Pesticide Residues in Honey by Modified QuEChERS Method and Gas Chromatography with Electron Capture Detection.” *Journal of the Brazilian Chemical Society* 25 (8): 1355–64. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20140117>.
- Perestrelo, Rosa, Pedro Silva, Priscilla Porto-Figueira, Jorge A.M. Pereira, Catarina Silva, Sonia Medina, and José S. Câmara. 2019. “QuEChERS - Fundamentals, Relevant Improvements, Applications and Future Trends.” *Analytica Chimica Acta*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.02.036>.
- Peris-vicente, Juan. 2015. “Juan Peris-Vicente et.al. (2015). Validation of Analytical Methods Based on Chromatographic Techniques: An Overview, *Analytical Separation Science*, 5, 1757-1808,” 1–52. [http://www.demarcheiso17025.com/document/Validation of Analytical Methods Based on Chromatographic - An Overview.pdf](http://www.demarcheiso17025.com/document/Validation%20of%20Analytical%20Methods%20Based%20on%20Chromatographic%20-%20An%20Overview.pdf).
- “PubChem.” 2022a. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4004> (consultado a 22/12/2022).
- “PubChem.” 2022b. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5377791> (consultado a 22/12/2022).
- Rejczak, Tomasz, and Tomasz Tuzimski. 2015. “A Review of Recent Developments and Trends in the QuEChERS Sample Preparation Approach.” *Open Chemistry*. De Gruyter Open Ltd. <https://doi.org/10.1515/chem-2015-0109>.
- Restek. 2022. “Rxi-5Sil MS Columns,” 1–8. <http://m.restek.com/pdfs/CFBR1302A-UNV>.
- Rey-Stolle, Fernanda, Danuta Dudzik, Carolina Gonzalez-Riano, Miguel Fernández-García, Vanesa Alonso-Herranz, David Rojo, Coral Barbas, and Antonia García. 2022. “Low and High Resolution Gas Chromatography-Mass Spectrometry for Untargeted Metabolomics: A Tutorial.” *Analytica Chimica Acta* 1210. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339043>.
- Ribeiro, Mariana Paixão Varela. 2021. “Determinação De Glifosato Em Amostras Alimentares (Frutos E Vegetais).”
- SANTE/11312/2021. 2021. “Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed SANTE 11312/2021.” *European Commission*, 1–

57. https://www.accredia.it/app/uploads/2016/01/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2017-11813.pdfhttps://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/SANTE_11312_2021.
- “SGS, About SGS.” 2023. <https://www.sgs.com/en/our-company/about-sgs> (consultado a 27/01/2023).
- “SGS, Our History.” 2023. <https://www.sgs.com/en/our-company/about-sgs/our-history> (consultado a 27/01/2023).
- “SGS Portugal, Agricultura & Alimentação.” 2023. <https://www.sgs.pt/pt-pt/agriculture-food/food/food-contaminant-testing/pesticide-residue-testing> (consultado a 06/02/2023).
- “SGS Portugal, Sobre a SGS.” 2023. <https://www.sgs.pt/pt-pt/our-company/about-sgs/sgs-in-brief> (consultado a 31/01/2023).
- “Shimadzu.” 2023. <https://store.shimadzu.com/p-55892-rxi-5sil-ms-cap-column-30m-025mm-id-025um.aspx> (consultado a 23/02/2023).
- Shukla, Sudhir K., Neelam Mangwani, T. Subba Rao, and Surajit Das. 2014. “Biofilm-Mediated Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons.” *Microbial Biodegradation and Bioremediation*, 204–32. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800021-2.00008-X>.
- Sidhu, Gurpreet Kaur, Simranjeet Singh, Vijay Kumar, Daljeet Singh Dhanjal, Shivika Datta, and Joginder Singh. 2019. “Toxicity, Monitoring and Biodegradation of Organophosphate Pesticides: A Review.” *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 49 (13): 1135–87. <https://doi.org/10.1080/10643389.2019.1565554>.
- “Sigma Aldrich.” 2023. <https://www.sigmaaldrich.com/PT/en> (consultado a 11/01/2023).
- Singh, Baljinder, Jagdeep Kaur, and Kashmir Singh. 2014. “Microbial Degradation of an Organophosphate Pesticide, Malathion.” *Critical Reviews in Microbiology* 40 (2): 146–54. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.763222>.
- Socas-Rodríguez, Bárbara, Javier González-Sálamo, Antonio V. Herrera-Herrera, Javier Hernández-Borges, and Miguel Rodríguez-Delgado. 2017. “Recent Advances and Developments in the QuEChERS Method.” *Comprehensive Analytical Chemistry* 76: 319–74. <https://doi.org/10.1016/bs.coac.2017.01.008>.
- Špánik, Ivan, and Andrea Machyňáková. 2018. “Recent Applications of Gas Chromatography with High-Resolution Mass Spectrometry.” *Journal of Separation Science*. <https://doi.org/10.1002/jssc.201701016>.
- Su, Rui, Xu Xu, Xinghua Wang, Dan Li, Xueyuan Li, Hanqi Zhang, and Aimin Yu. 2011. “Determination of Organophosphorus Pesticides in Peanut Oil by Dispersive Solid Phase Extraction Gas Chromatography-Mass Spectrometry.” *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 879 (30): 3423–28. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.09.016>.
- Tankiewicz, Maciej, and Andrzej Berg. 2022. “Improvement of the QuEChERS Method Coupled with GC–MS/MS for the Determination of Pesticide Residues in Fresh Fruit and Vegetables.” *Microchemical Journal* 181 (May). <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107794>.
- Tsai, W. T. 2014. *Organochlorine Insecticides. Encyclopedia of Toxicology: Third Edition*. Third Edit. Vol. 3. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00172-X>.
- Tudi, Muyesaier, Huada Daniel Ruan, Li Wang, Jia Lyu, Ross Sadler, Des Connell, Cordia Chu, and Dung Tri Phung. 2021. “Agriculture Development, Pesticide Application and Its Impact on the

- Environment.” *International Journal of Environmental Research and Public Health* 18 (3): 1–24. <https://doi.org/10.3390/ijerph18031112>.
- Tuzimski, Tomasz, and Tomasz Rejczak. 2016. “Application of HPLC-DAD after SPE/QuEChERS with ZrO₂-Based Sorbent in d-SPE Clean-up Step for Pesticide Analysis in Edible Oils.” *Food Chemistry* 190: 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.072>.
- Varela-Martínez, Diana Angélica, Miguel Ángel González-Curbelo, Javier González-Sálamo, and Javier Hernández-Borges. 2019. “Analysis of Multiclass Pesticides in Dried Fruits Using QuEChERS-Gas Chromatography Tandem Mass Spectrometry.” *Food Chemistry* 297 (April): 124961. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.124961>.
- Wittmann, Christoph. 2007. “Fluxome Analysis Using GC-MS.” *Microbial Cell Factories* 6: 1–17. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-6-6>.
- Zhang, Anping, Xuemei Xie, Jing Ye, Chunmian Lin, and Xiaoyan Hu. 2011. “Stereoselective Toxicity of Malathion and Its Metabolites, Malaoxon and Isomalathion.” *Environmental Chemistry Letters* 9 (3): 369–73. <https://doi.org/10.1007/s10311-010-0288-9>.

APÊNDICE A

SOLUÇÕES PADRÃO DE MISTURA DE PESTICIDAS

Tabela A 1 - Soluções de mistura de pesticidas *Restek* utilizadas neste trabalho.

Solução	Pesticidas	
GC1 (cat.32563: GC Padrão de pesticidas multiresíduos #1)	Compostos organofosfatos	Azinfos etilo; Azinfos metilo; Clorpirifos; Clorpirifos metilo; Diazinão; EPN; Fenitrotião; Isazofos; Fosalone; Fosmete; Pirimifos etilo; Pirimifos metilo; Piraclofos; Pirazofos; Piridafentião; Quinalfos
GC2 (cat.32564: GC Padrão de pesticidas multiresíduos #2)	Compostos organoclorados	Aldrina; alfa-BHC; beta-BHC; delta-BHC; gama-BHC (Lindano); Clorobenside; cis-Clordano; transclordano; Clorfenson (Ovex); Cloronebe; 2,4'-DDD; 4,4'-DDD; 2,4'-DDE; 4,4'-DDE; 2,4'-DDT; 4,4'-DDT; 4,4'-Diclorobenzofenona; Dieldrina; Endossulfano I; Endossulfano II; éter endossulfano; Sulfato de endossulfano; Endrina; aldeído de endrina; Endrina cetona; Etilano (Pertano); Fenson; Heptaclo; Epóxido de heptaclo (Isômero B); Hexaclorobenzeno; Isodrina; 2,4'-Metoxicloro; 4,4'-Metoxiclorolefina; Mirex; cis-Nonacloro; trans-Nonacloro; Pentacloroanisol; Pentaclorobenzeno; Pentaclorotioanisol; Tetradição
GC3 (cat.32565: GC Padrão de pesticidas multiresíduos #3)	Compostos organonitrogénicos	Benfluralina; bifenilo; Clorotalonil; Diclofluanida; Diclorano; 3,4-Dicloroanilina; 2,6-Diclorobenzonitrila (Diclobenil); Difetilamina; Etalfluralina; Flucloralina; Isopropalina; Nitalina; Nitrofenol; Oxifluorfenol; Pendimetalina; Pentacloroanilina; Pentaclorobenzonitrila; Pentacloronitrobenzeno (Quintozeno); Prodiamina; Profluralina; 2,3,5,6-Tetracloroanilina; Tetracloronitrobenzeno (Tecnazene); THPI (Tetrahidroftalimida); Tolilfluanida; Trifluralina
GC4 (cat.32566: GC Padrão de pesticidas multiresíduos #4)	Compostos organonitrogénicos	Acetocloro; Alacloro; Alidocloro; Clomazone (Comando); Cicloato; Discar (cis e trans); Dimetacloro; Difenamida; Fenpropatrina; Fluquinconazol; Flutolanil; Linurão; Metazacloro; Metoxicloro; Metolacloro; N-(2,4-Dimetilfenil)formamida; Norflurazona; Oxadiazônio; Pebular; Pretilacloro; Procloraz; Propacloro; Propanil; Propisocloro; Propizamida; Piridabeno; Tebufenpirade; Trialato
GC5 (cat.32567: GC Padrão de pesticidas multiresíduos #5)	Compostos organonitrogénicos	Atrazina; Bupirimato; Captafol; Captan; Clorfenapir; Ciprodinil; Etofenprox; Etridiazol; Fenarimol; Fipronil; Fludioxonil; Fluridona (Sonar); Flusilazol; Flutriafol; Folpete; Hexazinona (Velpar); Iprodiona; Lenacila; MGK-264; Miclobutanil; Paclobutrazol; Penconazol; Proclimidona; Propargita; Pirimetanil; Piriproxifeno; Tebuconazol; Terbacil; Terbutilazina; Triadimefão; Triadimenol; Triciclazol (Feixe); Triflumizol; Vinclozolina
GC6 (cat.32568: GC Padrão de pesticidas multiresíduos #6)	Compostos piretroides sintéticos	Acrinatrina; Antraquinona; Bifentrina; Bioaletrina; Ciflutrina; lambda-cialotrina; Cipermetrina; Deltametrina; Fenvalerato; Flucitrinato; tau-Fluvalinato; cis-Permetrina; trans-Permetrina; Fenotrina (cis e trans); Resmetrina; Teflutrina; Tetrametrina; Transflutrina
GC7 (cat.32569: GC Padrão de pesticidas multiresíduos #7)	Herbicidas ésteres metílicos	Acequinocilo; Bromopropilato; Carfentrazone etila; Clorbenzilato; Clorprofame; Clozolinato; éster metílico de DCPA (clortal-dimetilo); Fluazifop-p-butil; Metalaxil; 2-Fenilfenol
GC8	Compostos organofosfatos	Bromfenvinfos-metilo; Bromfenvinfos; Bromofos etílico; Bromofos metilo; Carbofenotion; Clorfenvinfos; Clortiofos; Comafos; Edifenvinfos; Etião; Fenamifos; Fenclorfos (Ronnel);

(cat.32570: GC Padrão de pesticidas multiresíduos #8)		Fentião; Iodofenfos; Leptofos; Malatião; Metacrifos; Profenofos; Protiofos; Sulfotep; Sulprofos; Terbufos; Tetraclorvinfos; Tolclofos-metil
GC9 (cat.32571: GC Padrão de pesticidas multiresíduos #9)	Compostos organofosfatos	Dissulfotão; Fonofos; Paratião metílico; Mevinfos; Paratião (Etil paratião); Forato; Butóxido de piperonila; Triazofos

APÊNDICE B

TESTE DA HOMOGENEIDADE DE VARIÂNCIAS

Tabela A 2 - Resultados obtidos no teste da homogeneidade de variâncias para a validação do clorfenvinfos na amêndoa.

Teste da Homogeneidade de Variâncias								
Pesticida	Clorfenvinfos							
Matriz	Amêndoa							
Calibrador	Concentração esperada (ppb)	Ensaio	Concentração obtida (ppb)	Média das concentrações (ppb)	S	S ²	PG	F
1	5	1	5,573	5,316	0,410	0,821	4,1	5,4
		2	5,654					
		3	5,167					
		4	5,888					
		5	5,213					
		6	4,839					
		7	4,815					
		8	5,688					
		9	5,556					
		10	4,768					
6	10	1	100,448	102,125	1,683	3,366	4,1	5,4
		2	104,631					
		3	104,721					
		4	100,756					
		5	102,208					
		6	101,536					
		7	101,254					
		8	101,758					
		9	103,767					
		10	100,166					

Tabela A 3 - Resultados obtidos no teste da homogeneidade de variâncias para a validação do clorfenvinfos no amendoim.

Teste da Homogeneidade de Variâncias								
Pesticida	Clorfenvinfos							
Matriz	Amendoim							
Calibrador	Concentração esperada (ppb)	Ensaio	Concentração obtida (ppb)	Média das concentrações (ppb)	S	S ²	PG	F
1	5	1	5,056	4,833	0,426	0,851	4,1	5,4
		2	5,299					
		3	4,340					
		4	5,410					
		5	4,100					
		6	5,051					
		7	5,073					
		8	4,863					
		9	4,614					
		10	4,523					
6	10	1	98,661	101,164	1,762	3,524	4,1	5,4
		2	103,724					
		3	100,208					
		4	103,541					
		5	99,722					
		6	101,926					
		7	102,061					
		8	99,069					
		9	100,801					
		10	101,923					

Tabela A 4 - Resultados obtidos no teste da homogeneidade de variâncias para a validação do malatião na amêndoa.

Teste da Homogeneidade de Variâncias								
Pesticida	Malatião							
Matriz	Amêndoa							
Calibrador	Concentração esperada (ppb)	Ensaio	Concentração obtida (ppb)	Média das concentrações (ppb)	S	S ²	PG	F
1	5	1	5,354	5,054	0,302	0,604	3,9	5,4
		2	5,296					
		3	5,395					
		4	5,319					
		5	5,176					
		6	4,992					
		7	4,945					
		8	4,763					
		9	4,795					
		10	4,502					
6	10	1	102,101	104,086	1,172	2,343	3,9	5,4
		2	105,856					
		3	103,239					
		4	102,955					
		5	105,504					
		6	103,877					
		7	103,932					
		8	103,774					
		9	104,975					
		10	104,651					

Tabela A 5 - Resultados obtidos no teste da homogeneidade de variâncias para a validação do malatião no amendoim.

Teste da Homogeneidade de Variâncias								
Pesticida	Malatião							
Matriz	Amendoim							
Calibrador	Concentração esperada (ppb)	Ensaio	Concentração obtida (ppb)	Média das concentrações (ppb)	S	S ²	PG	F
1	5	1	4,774	5,091	0,338	0,677	4,7	5,4
		2	4,690					
		3	4,471					
		4	5,392					
		5	5,190					
		6	5,002					
		7	5,295					
		8	5,325					
		9	5,339					
		10	5,435					
6	10	1	99,177	101,309	1,603	3,205	4,7	5,4
		2	103,463					
		3	100,668					
		4	99,976					
		5	101,501					
		6	103,412					
		7	102,764					
		8	102,030					
		9	100,906					
		10	99,191					

TESTE DE MANDEL

Tabela A 6 - Resultados obtidos no teste de *Mandel* para a validação do clorfenvinfos na amêndoa.

Teste de Mandel							
Pesticida	Clorfenvinfos						
Matriz	Amêndoa						
Calibrador	Concentração esperada (ppb)	Sinal do equipamento	Sinal do ajuste linear	Sinal do ajuste polinomial	DS ²	PG	F
1	5	10277	9111	8985	9,65×10 ⁴	0,02	10,12
2	10	14792	15314	15251			
3	25	31646	33925	34006			
4	50	67480	64942	65120			
5	75	95161	95960	96052			
6	100	126866	126977	126804			
		a	1240,7	-0,1448			
		b	2907,3	1255,4			
		c		2711,8			
		S	1865,2	2146,3			

Tabela A 7 - Resultados obtidos no teste de Mandel para a validação do clorfenvinfos no amendoim.

Teste de Mandel							
Pesticida	Clorfenvinfos						
Matriz	Amendoim						
Calibrador	Concentração esperada (ppb)	Sinal do equipamento	Sinal do ajuste linear	Sinal do ajuste polinomial	DS ²	PG	F
1	5	9488	9535	8576	-2,97×10 ⁸	-2,79	10,12
2	10	16609	16382	15251			
3	25	34150	36921	34006			
4	50	74578	71154	65120			
5	75	106218	105386	96052			
6	100	137960	139619	126804			
		a	1369,3	-1,1076			
		b	2688,5	1482,1			
		c		1192,9			
		S	2392,8	10327			

Tabela A 8 - Resultados obtidos no teste de Mandel para a validação do malatião na amêndoa.

Teste de Mandel							
Pesticida	Malatião						
Matriz	Amêndoa						
Calibrador	Concentração esperada (ppb)	Sinal do equipamento	Sinal do ajuste linear	Sinal do ajuste polinomial	DS ²	PG	F
1	5	104484	93470	102528	5,04×10 ⁸	1,05	10,12
2	10	163809	167155	171673			
3	25	383623	388210	382243			
4	50	766003	756635	743652			
5	75	1090314	1125060	1118133			
6	100	1515812	1493485	1505687			
		a	14737	10,458			
		b	19785	13672			
		c		33907			
		S	22062	21936			

Tabela A 9 - Resultados obtidos no teste de Mandel para a validação do malatião no amendoim.

Teste de Mandel							
Pesticida	Malatião						
Matriz	Amendoim						
Calibrador	Concentração esperada (ppb)	Sinal do equipamento	Sinal do ajuste linear	Sinal do ajuste polinomial	DS ²	PG	F
1	5	93829	98985	92086	-4,72×10 ¹⁰	-2,84	10,12
2	10	194187	180640	171673			
3	25	392492	425605	382243			
4	50	867973	833880	743652			
5	75	1244243	1242155	1118133			
6	100	1639070	1650430	1505687			
		a	16331	-7,9684			
		b	17330	17143			
		c		6570,2			
		S	25506	128796			

LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO – ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO

Tabela A 10 - Resultados obtidos nos ensaios de recuperação para a determinação do LQ na validação do clorfenvinfos na amêndoa.

Pesticida	Clorfenvinfos		
Matriz	Amêndoa		
Ensaio	Data	Concentração obtida (ppb)	Recuperação (%)
1	02/11/2022	13,38	99,14
2	08/11/2022	9,80	72,59
3	06/12/2022	11,33	83,90
4	06/12/2022	12,13	89,85
5	05/01/2023	12,38	91,71
6	05/01/2023	14,28	105,74
7	05/01/2023	11,81	87,47
8	11/01/2023	10,73	79,47
9	11/01/2023	11,19	82,87
10	14/02/2023	12,75	94,44
11	14/02/2023	13,30	98,55
12	01/03/2023	10,58	78,38
13	01/03/2023	9,79	72,49
	Média	11,80	87,43
	S	1,40	10,37
	CV (%)	11,86	11,86

Tabela A 11 - Resultados obtidos nos ensaios de recuperação para a determinação do LQ na validação do clorfenvinfos no amendoim.

Pesticida	Clorfenvinfos		
Matriz	Amendoim		
Ensaio	Data	Concentração obtida (ppb)	Recuperação (%)
1	14/11/2022	12,08	89,49
2	06/12/2022	13,99	103,65
3	06/12/2022	11,81	87,50
4	06/12/2022	14,88	110,20
5	05/01/2023	10,08	74,65
6	05/01/2023	10,56	78,22
7	05/01/2023	12,92	95,69
8	11/01/2023	12,19	90,30
9	11/01/2023	11,48	85,01
10	11/01/2023	10,18	75,42
11	19/01/2023	12,72	94,19
12	19/01/2023	10,54	78,04
13	19/01/2023	14,46	107,09
14	14/02/2023	13,17	97,53
15	14/02/2023	12,63	93,54
16	14/02/2023	11,33	83,90
17	01/03/2023	13,81	102,31
	Média	12,28	90,98
	S	1,49	11,01
	CV (%)	12,10	12,10

Tabela A 12 - Resultados obtidos nos ensaios de recuperação para a determinação do LQ na validação do malatião na amêndoa.

Pesticida	Malatião		
Matriz	Amêndoa		
Ensaio	Data	Concentração obtida (ppb)	Recuperação (%)
1	02/11/2022	11,92	88,30
2	08/11/2022	11,65	86,32
3	06/12/2022	12,51	92,64
4	06/12/2022	12,57	93,09
5	05/01/2023	12,47	92,37
6	05/01/2023	13,47	99,75
7	05/01/2023	11,33	83,96
8	11/01/2023	10,84	80,26
9	11/01/2023	10,74	79,58
10	01/03/2023	9,80	72,62
	Média	11,73	86,89
	S	1,08	8,02
	CV (%)	9,23	9,23

Tabela A 13 - Resultados obtidos nos ensaios de recuperação para a determinação do LQ na validação do malatião no amendoim.

Pesticida	Malatião		
Matriz	Amendoim		
Ensaio	Data	Concentração obtida (ppb)	Recuperação (%)
1	14/11/2022	11,87	87,93
2	06/12/2022	12,78	94,69
3	06/12/2022	12,73	94,27
4	06/12/2022	13,03	96,52
5	05/01/2023	10,87	80,50
6	05/01/2023	9,99	74,01
7	05/01/2023	9,67	71,60
8	11/01/2023	9,55	70,77
9	19/01/2023	12,78	94,67
10	19/01/2023	11,43	84,68
11	19/01/2023	11,36	84,11
12	14/02/2023	12,40	91,84
13	14/02/2023	9,63	71,33
14	14/02/2023	10,71	79,35
15	01/03/2023	13,49	99,94
	Média	11,49	85,08
	S	1,36	10,10
	CV (%)	11,87	11,87