

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**Avaliação de tecnologias de microextração alternativas para  
monitorização e controlo da qualidade da água - Aplicação aos  
pesticidas organofosforados**

Maria Abreu Santos Costa Soares

**Mestrado em Química**  
Especialização em Química

Dissertação orientada por:  
Prof. Doutor José Manuel Florêncio Nogueira



## Agradecimentos

A realização desta dissertação só foi possível graças ao contributo, direto ou indireto, de várias pessoas, às quais expressei o meu profundo agradecimento.

Agradeço à Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, em especial ao Departamento de Química e Bioquímica, pelo acolhimento e suporte académico ao longo desta jornada.

Ao Professor Catedrático José Manuel Florêncio Nogueira, manifesto a minha gratidão pela orientação e disponibilidade ao longo deste percurso. A sua experiência e aconselhamento foram determinantes para o desenvolvimento deste projeto, e é com grande apreço que agradeço a oportunidade de integrar o seu grupo de investigação.

Ao meu pai a quem devo não só a minha formação, mas muito do que sou. Por seres o meu exemplo de determinação e resiliência, que sempre me apoiou incondicionalmente. Obrigada por estares sempre presente, mesmo quando apenas fingias entender os meus monólogos sobre o projeto.

Aos meus Niscos, que terão sempre um lugar especial no meu coração.

Um agradecimento especial à Marisa. Pelo apoio incansável, pela paciência inabalável e por todas as palavras certas nos momentos certos. A tua dedicação e espírito de equipa fizeram toda a diferença neste percurso. Sem o teu apoio eu teria passado metade do tempo a questionar a ciência e a outra metade a questionar as minhas escolhas de vida. Obrigada por me lembrares, mesmo nos dias mais caóticos, que comer e descansar são processos essenciais para a sobrevivência. Entre gráficos, solventes e problemas com aparelhos, foste a variável constante que manteve esta experiência sob controle.

Ao Filipe, agradeço pelas tuas palavras de encorajamento, pelo apoio emocional nos momentos difíceis e por sempre saberes como me motivar quando eu mais precisei. O teu apoio foi vital para a minha perseverança e confiança durante todo o processo. Obrigada por estares sempre do meu lado, mesmo quando as minhas conversas eram uma mistura de ciência, stress e falta de sono.

A vocês, Manel, Pio, Chicken, Feno, Marie Jane, Rita e Susana, que garantiram que eu não me esquecia da importância da diversão no meio do caos. Obrigada pelo apoio, pelas conversas, pelos risos e, acima de tudo, por me lembrarem de que a vida não se resume apenas a prazos e dissertações. Se esta tese tivesse um fator de recuperação emocional, vocês seriam os responsáveis por mantê-lo sempre acima do limite crítico.

Por fim, aos meus colegas de laboratório, obrigado por estarem sempre por perto, pela colaboração e por tornarem os momentos mais intensos um pouco mais leves. E um agradecimento especial ao café, que foi um grande herói durante todo este processo.

## Resumo

A modernização da agricultura, influenciada pelo crescimento populacional e pela industrialização, introduziu práticas como a utilização de agroquímicos, incluindo pesticidas sintéticos. Embora eficazes no controlo de pragas e no aumento da produção agrícola, estes compostos apresentam riscos para o ecossistema devido à elevada persistência e toxicidade. Neste sentido, uma monitorização contínua é crucial para mitigar riscos ambientais e proteger a saúde humana.

Este projeto teve como objetivo desenvolver e aplicar uma técnica de microextração inovadora, a microextração em fibra oca (HF $\mu$ E), para a monitorização de cinco pesticidas organofosforados (etoprofos, diazião, metil-paratião, malatião e clorpirifos) seguida de análise por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS).

Durante a otimização, estabeleceram-se as condições de microextração: *dual*-HF $\mu$ E(*n*-C<sub>8</sub>:Tol; 1:1, v/v), 2h (1600 rpm), 10% MeOH e 10% NaCl; e retroextração por ultrassons durante 2 min. Na validação, a metodologia apresentou LODs e LOQs compreendidos entre 0,03-0,10  $\mu$ g/L e 0,07-0,50  $\mu$ g/L, respetivamente e gamas lineares dinâmicas (0,07-5,00  $\mu$ g/L), que evidenciaram boa linearidade ( $r^2 \geq 0,9947$ ). Neste sentido, o método cumpriu o Decreto-Lei n.º236/98 referente à monitorização de águas superficiais, embora apenas o diazião e o clorpirifos atendam ao limite para pesticidas individuais (0,1  $\mu$ g/L) da Diretiva (UE) 2020/2184 para a água potável. Os ensaios de precisão resultaram em níveis de repetibilidade (RSD  $\leq 18,8\%$ ) e de precisão intermédia (RSD  $\leq 18,3\%$ ) muito aceitáveis. Posteriormente, aplicou-se a metodologia a matrizes aquosas ambientais, nomeadamente águas provenientes de ETAR, de estuário e da torneira, recorrendo ao método da adição padrão, tendo-se obtido boa linearidade ( $r^2 > 0,9935$ ) para níveis de fortificação compreendidos entre 1,0-20,0  $\mu$ g/L.

Os resultados encontrados demonstram que a metodologia proposta é alternativa às tecnologias de microextração passiva mais comuns, uma vez evidenciar grande simplicidade e elevada seletividade, para além de demonstrar bom desempenho na análise vestigial de pesticidas organofosforados em matrizes de água superficial.

**Palavras-chave:** Pesticidas organofosforados, Microextração em fibra oca (HF $\mu$ E), Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS), Matrizes aquosas ambientais

## Abstract

The modernization of agriculture, driven by population growth and industrialization, has led to the use of agrochemicals, such as synthetic pesticides. While effective in pest control and increasing production, these compounds pose risks to the ecosystem due to their persistence and toxicity. Therefore, continuous monitoring is crucial to mitigate environmental risks and protect human health.

This project aimed to develop and apply an innovative microextraction technique, hollow fiber microextraction (HF $\mu$ E), to monitor five organophosphorus pesticides (ethoprophos, diazinon, methylparathion, malathion, and chlorpyrifos), followed by analysis using gas chromatography mass spectrometry (GC-MS).

During the optimization stage, the microextraction conditions were established as follows: dual-HF $\mu$ E (*n*-C<sub>8</sub>:Tol; 1:1, v/v), 2 hours (1600 rpm), 10% MeOH, and 10% NaCl; with back-extraction by ultrasound for 2 minutes. In the validation stage, the methodology presented LOD and LOQ values ranging from 0.03-0.10  $\mu$ g/L and 0.07-0.50  $\mu$ g/L, respectively, and dynamic linear ranges (0.07–5.00  $\mu$ g/L), demonstrating good linearity ( $r^2 \geq 0.9947$ ). Thus, the method fully complied with Decreto-Lei n.º 236/98 regarding surface water monitoring, but only diazinon and chlorpyrifos met the individual pesticide limit (0.1  $\mu$ g/L) established by Diretiva (UE) 2020/2184 for drinking water. Precision tests resulted in highly acceptable repeatability levels (RSD  $\leq$  18.8%) and intermediate precision levels (RSD  $\leq$  18.3%). Afterward, the methodology was applied to environmental aqueous matrices, namely wastewater, estuarine water, and tap water, using the standard addition method. Good linearity ( $r^2 > 0.9935$ ) was achieved for fortification levels ranging from 1.0-20.0  $\mu$ g/L.

The results demonstrate that the proposed methodology is a viable alternative to the most common passive microextraction technologies, as it exhibits great simplicity and high selectivity, in addition to showing good performance in trace analysis of organophosphorus pesticides in surface water matrices.

**Keywords:** Organophosphorus pesticides, Hollow fiber microextraction (HF $\mu$ E), Gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS), Environmental aqueous matrices

## Comunicação em poster

Soares, M.\*, Nogueira, J. M. F., *Determination of trace levels of organophosphate pesticides in water matrices by BA $\mu$ E/GC-MS(SIM)*. Apresentado no 13<sup>o</sup> Encontro Nacional de Cromatografia (presencial; e-poster), Lisboa, Portugal. 17 a 19 de dezembro 2023

Soares, M.\*, Nogueira, J. M. F., *Water quality assessment: Monitoring trace levels of organophosphate pesticides by HF $\mu$ E/GC-MS(SIM)*. Apresentado no CQE Days (presencial), Lisboa, Portugal. 18 a 19 de junho 2024.

Soares, M.\*, Nogueira, J. M. F., *Monitoring trace levels of organophosphate pesticides in water: an HF $\mu$ E/GC-MS(SIM) approach*. Apresentado no ChemBioChem (presencial), Lisboa, Portugal. 27 de junho de 2024.

# Índice

1.	Introdução .....	1
1.1.	Surgimento e popularização dos pesticidas.....	1
1.2.	A segunda geração de pesticidas: O surgimento dos OPs .....	3
1.3.	Classificação e estabilidade ambiental dos pesticidas.....	3
1.4.	Modo de atuação dos OPs.....	4
1.5.	Classificação dos pesticidas pela OMS com base na toxicidade.....	5
1.6.	Pesticidas organofosforados.....	6
1.6.1.	Etoprofos.....	7
1.6.2.	Diazião .....	8
1.6.3.	Metil-Paratião.....	9
1.6.4.	Malatião .....	10
1.6.5.	Clorpirifos .....	11
1.7.	Preparação de amostras.....	12
1.7.1.	Monitorização vestigial dos OPs.....	12
1.7.2.	Técnicas de extração .....	12
1.8.	Análise instrumental .....	16
1.8.1.	Cromatografia em fase gasosa (GC) .....	17
1.8.2.	Espectrometria de massa (MS).....	19
1.8.3.	Hifenação GC-MS.....	21
2.	Objetivos.....	22
3.	Parte Experimental.....	23
3.1.	Material, reagentes e amostras .....	23
3.2.	Equipamentos e instrumentação.....	23
3.3.	Procedimento .....	24
3.3.1.	Preparação da solução padrão .....	24
3.3.2.	Calibração instrumental.....	24
3.3.3.	Preparação dos dispositivos HF $\mu$ E.....	24
4.	Discussão de Resultados.....	28
4.1.	Otimização das condições instrumentais.....	28
4.2.	Calibração Instrumental .....	30
4.3.	Otimização do método HF $\mu$ E.....	30
4.3.1.	Seleção do solvente .....	30
4.3.2.	Otimização da etapa de retroextração.....	32
4.3.3.	Otimização da etapa de microextração.....	33
4.3.4.	Efeito da <i>dual</i> -HF $\mu$ E.....	37
4.4.	Validação da <i>dual</i> -HF $\mu$ E- $\mu$ LD/GC-MS(SIM).....	39
4.4.1.	Sensibilidade e linearidade.....	39
4.4.2.	Seletividade e precisão .....	40

4.5.	Aplicação do método a matrizes reais.....	41
4.6.	Comparação com outras técnicas de microextração.....	43
5.	Conclusões e perspectivas futuras .....	45
	Bibliografia .....	47
	Anexos .....	55
	Anexo I- Cálculos e conceitos cromatográficos.....	55
	Anexos II- Espectros de massa característicos dos OPs em estudo; retirado do <i>NIST</i> [95]. .....	58
	Anexo III- Cromatogramas obtidos aplicando o método HF $\mu$ E- $\mu$ LD/LVI-GC-MS a matrizes reais.....	60

## Lista de figuras

Figura 1.1- Utilização das diferentes categorias de pesticidas a nível mundial; adaptado de [6].	2
Figura 1.2- Utilização de pesticidas em Portugal entre 1990-2022; adaptado de [10].	2
Figura 1.3- Classificação comum dos pesticidas tendo em conta a composição química; adaptado de [14].	4
Figura 1.4- Exposição a pesticidas organofosforados: Interação com a acetilcolina; adaptado de [16].	5
Figura 1.5- Estrutura química dos OPs; adaptado de [19].	7
Figura 1.6- Estrutura química do etoprofos.	8
Figura 1.7- Estrutura química do diazião.	8
Figura 1.8- Estrutura química do metil-paratião.	9
Figura 1.9- Estrutura química do malatião.	10
Figura 1.10- Estrutura química do clorpirifos.	11
Figura 1.11- Evolução das técnicas de extração clássicas para as técnicas miniaturizadas.	13
Figura 1.12- Esquematisação simplificada da configuração para as duas etapas, microextração e retroextração, dos ensaios HF $\mu$ E-LD realizados neste projeto. Esquema criado no Biorender.com.	16
Figura 1.13- Esquema simplificado de um cromatógrafo em fase gasosa (GC); adaptado de [72].	17
Figura 1.14- Esquema da injeção em modo split (a) e em modo splitless (b); adaptado de [74].	18
Figura 1.15- Esquema do injetor PTV; adaptado de [73].	18
Figura 1.16- Esquema do simplificado espectrómetro de massa; adaptado de [76].	19
Figura 1.17- Representação esquemática do quadrupolo; adaptado de [73]. Esquema criado no BioRender.com.	20
Figura 1.18- Esquema do detetor multiplicador de eletrões; adaptado de [77].	21
Figura 1.19- Esquema do GC-MS; adaptado de [76]. Esquema criado no BioRender.com.	21
Figura 3.1- Esquema ilustrativo da HF $\mu$ E em flutuação durante a extração. Abreviatura: PP - polipropileno. Esquema criado no BioRender.com.	25
Figura 3.2- Fluxograma da otimização univariada das diferentes fases da microextração por HF $\mu$ E.	25
Figura 4.1- Cromatogramas obtidos por GC-MS da solução padrão injetada em modo <i>splitless</i> a concentração 10 mg/L (a) e em modo <i>solvent vent</i> (PTV) a 1 mg/L (b). 1. Etoprofos, 2. Diazião, 3. Metil-paratião, 4. Malatião, 5. Clorpirifos.	29
Figura 4.2- Estudo da seletividade dos diferentes solventes testados na recuperação dos OPs em estudo, em meio aquoso, obtido por HF $\mu$ E- $\mu$ LD/GC-MS(SIM). Ensaios realizados em triplicado. Condições experimentais: microextração, 1 h (1000 rpm); retroextração, 10 min sob tratamento ultrassónico. As barras de erro representam o desvio padrão de três replicados.	31
Figura 4.3- Estudo da seletividade de três solventes testados ( <i>n</i> -C <sub>7</sub> , <i>n</i> -C <sub>8</sub> e <i>n</i> -C <sub>9</sub> ) na recuperação dos OPs em estudo, em meio aquoso, obtido por HF $\mu$ E- $\mu$ LD/GC-MS(SIM). As análises foram efetuadas em triplicado. As barras de erro representam o desvio padrão de três replicados.	31
Figura 4.4- Efeito do tempo de retroextração na recuperação dos OPs em estudo, em meio aquoso, obtido por HF $\mu$ E- $\mu$ LD/GC-MS(SIM) utilizando os solventes de extração <i>n</i> -C <sub>9</sub> e <i>n</i> -C <sub>8</sub> . Ensaios realizados em triplicado. Condições experimentais: microextração, 1 h (1000 rpm). As barras de erro representam o desvio padrão de três replicados.	32

Figura 4.5- Efeito da velocidade de agitação na recuperação dos OPs em estudo, em meio aquoso, obtido por HF $\mu$ E- $\mu$ LD/GC-MS(SIM), utilizando os solventes de extração <i>n</i> -C <sub>8</sub> e <i>n</i> -C <sub>9</sub> . As análises foram efetuadas em triplicado. Condições experimentais: 1 h microextração; retroextração, 2 min sob tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio padrão de três replicados. ....	34
Figura 4.6- Efeito do tempo de equilíbrio na recuperação dos OPs em estudo, em meio aquoso, obtido por HF $\mu$ E- $\mu$ LD/GC-MS(SIM) utilizando os solventes de extração <i>n</i> -C <sub>9</sub> e <i>n</i> -C <sub>8</sub> . Ensaio realizado em triplicado. Condições experimentais: microextração, 1600 rpm; retroextração, 2 min sob tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio padrão de três replicados. ....	34
Figura 4.7- Estudo do tempo de equilíbrio nas seguintes condições: <i>n</i> -C <sub>8</sub> : 1 h e 2 h; <i>n</i> -C <sub>9</sub> : 3 h, na recuperação dos OPs em estudo, em meio aquoso, obtido por HF $\mu$ E- $\mu$ LD/GC-MS(SIM). As análises foram efetuadas em triplicado. As barras de erro representam o desvio padrão de três replicados. ....	35
Figura 4.8- Efeito do modificador orgânico na recuperação dos OPs em estudo, em meio aquoso, obtido por HF $\mu$ E- $\mu$ LD/GC-MS(SIM). As análises foram efetuadas em triplicado. Condições experimentais: 2 h (1600 rpm); retroextração, 2 min sob tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio padrão de três replicados. ....	36
Figura 4.9- Efeito da força iônica da matriz na recuperação dos OPs em estudo, em meio aquoso, obtido por HF $\mu$ E- $\mu$ LD/GC-MS(SIM). As análises foram efetuadas em triplicado. Condições experimentais: 2 h (1600 rpm); retroextração, 2 min sob tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio padrão de três replicados. ....	37
Figura 4.10- Efeito da dual-HF <i>n</i> -C <sub>8</sub> : <i>n</i> -C <sub>8</sub> e dual-HF com diferentes solventes ( <i>n</i> -C <sub>8</sub> :Tol; <i>n</i> -C <sub>8</sub> :DCM) na recuperação dos OPs em estudo, em meio aquoso, obtido por HF $\mu$ E- $\mu$ LD/GC-MS(SIM). As análises foram efetuadas em triplicado. Condições experimentais: 2 h (1600 rpm); retroextração, 2 min sob tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio padrão de três replicados. ....	38
Figura 4.11- Parâmetros otimizados para a microextração por HF $\mu$ E- $\mu$ LD/GC-MS dos OPs em estudo, em meio aquoso. As análises foram efetuadas em seis replicados. Condições experimentais: ( <i>n</i> -C <sub>8</sub> :Tol) 2 h (1600 rpm); retroextração, 2 min de tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio padrão de seis replicados. ....	38
Figura I.I- Ilustração da separação de dois analitos por GC-MS. Retirado de [90].....	56
Figura II.II- Espetro de massa característico do diazião. ....	58

## Lista de tabelas

Tabela 1.1- Classificação de pesticidas recomendada pela OMS; retirado de [17].	6
Tabela 1.2- Informação sobre as ações, propriedades e regulamentação dos cinco OPs em estudo.	7
Tabela 1.3- Resumo das vantagens e desvantagens das técnicas de extração.	15
Tabela 4.1- Iões selecionados no modo SIM para cada analito. Iões de quantificação assinalados a negrito.	28
Tabela 4.2- Parâmetros analíticos do modo de injeção splitless e LVI e os tempos de retenção para cada OP.	29
Tabela 4.3- Resumo das condições otimizadas para o método desenvolvido.	39
Tabela 4.4- Gama linear e valores de LOD, LOQ e $r^2$ das recuperações dos diferentes valores de fortificação em água ultrapura obtidos por dual-HF $\mu$ E( $n$ -C <sub>8</sub> :Tol)- $\mu$ LD/LVI-GC-MS(SIM) sob condições experimentais otimizadas.	40
Tabela 4.5- Valores de repetibilidade e precisão intermédia, expressos como RSD (%), das recuperações dos diferentes valores de fortificação, em água ultrapura, obtidos por dual-HF $\mu$ E( $n$ -C <sub>8</sub> :Tol)- $\mu$ LD/LVI-GC-MS(SIM) sob condições experimentais otimizadas.	41
Tabela 4.6- Valores de recuperação média (R (%) $\pm$ RSD (%)) para os cinco OPs em estudo em amostras de água de ETAR, de torneira e de estuário (Porto Brandão) pelo método SAM, sob as condições experimentais otimizadas e validadas.	42
Tabela 4.7- Valores de $r^2$ para os cinco OPs em estudo em amostras de água de ETAR, de torneira e de estuário (Porto Brandão) pelo método SAM, sob as condições experimentais otimizadas e validadas.	42
Tabela 4.8- Comparação entre diferentes técnicas de microextração usadas na análise de OPs. (O sinal (-) indica que a técnica não possui a propriedade; o sinal (+) indica que a técnica possui a propriedade).	43

## Lista de abreviaturas, acrónimos, siglas e símbolos

ACh	Acetilcolina (do inglês <i>Acetylcholine</i> )
AChE	Acetilcolinesterase (do inglês <i>Acetylcholinesterase</i> )
BA $\mu$ E	Microextração adsorptiva em barra (do inglês <i>Bar Adsorptive Microextraction</i> )
DCM	Diclorometano
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DLLME	Microextração por dispersão líquido-líquido (do inglês <i>Dispersive Liquid-Liquid Microextraction</i> )
EI	Eletroionização
EUA	Estados Unidos da América
EtAc	Acetato de etilo (do inglês <i>ethyl acetate</i> )
ETAR	Estação de tratamento de águas residuais
<i>Full-scan</i>	Varrimento contínuo
GC	Cromatografia em fase gasosa (do inglês <i>Gas Chromatography</i> )
GC-MS	Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (do inglês <i>Gas Chromatography Mass Spectrometry</i> )
GHS	Sistema mundialmente harmonizado de classificação e rotulagem de produtos químicos (do inglês <i>Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals</i> )
HF	Fibra oca (do inglês <i>Hollow fiber</i> )
HF-LPME	Microextração em fase líquida com fibra oca (do inglês <i>Hollow Fiber Liquid-Phase Microextraction</i> )
HF $\mu$ E	Microextração em fibra oca (do inglês <i>Hollow Fiber Microextraction</i> )
LLE	Extração líquido-líquido (do inglês <i>Liquid-Liquid Extraction</i> )
LOD	Limite de deteção (do inglês <i>Limit of Detection</i> )
LOQ	Limite de quantificação (do inglês <i>Limit of Quantification</i> )
LPME	Microextração em fase líquida (do inglês <i>Liquid-Phase Microextraction</i> )
LVI	Injeção de grandes volumes (do inglês <i>Large Volume Injection</i> )
MS	Espectrometria de massa (do inglês <i>Mass Spectrometry</i> )
<i>n</i> -C <sub>6</sub>	<i>n</i> -hexano
<i>n</i> -C <sub>7</sub>	<i>n</i> -heptano
<i>n</i> -C <sub>8</sub>	<i>n</i> -octano
<i>n</i> -C <sub>9</sub>	<i>n</i> -nonano
OCs	Pesticidas organoclorados (do inglês <i>Organochlorine pesticides</i> )
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPs	Pesticidas organofosforados (do inglês <i>Organophosphate pesticides</i> )
OVAT	Otimização univariante (do inglês <i>One Variable at a Time</i> )
PAC	Política Agrícola Comum
PDMS	Polidimetilsiloxano
pH	Simétrico do logaritmo decimal da concentração de hidrogeniões

pKa	Simétrico do logaritmo decimal da constante de acidez
PP	Polipropileno
PTV	Injetor de vaporização com temperatura programada (do inglês <i>Programmable Temperature Vaporizing</i> )
$r^2$	Coefficiente de determinação
RF	Radiofrequência
rpm	Rotações por minuto
RSD	Desvio padrão relativo (do inglês <i>Relative Standard Deviation</i> )
S	Com divisão da amostra (do inglês <i>Split</i> )
S/N	Razão Sinal/Ruído (do inglês <i>Signal-to-Noise</i> )
S/SL	<i>Split/splitless</i>
SAM	Método da adição padrão (do inglês <i>Standard Addition Method</i> )
SBSE	Extração sortiva em barra de agitação (do inglês <i>Stir Bar Sorptive Extraction</i> )
SIM	Monitorização de iões selecionados (do inglês <i>Selected Ion Monitoring</i> )
SL	Sem divisão da amostra (do inglês <i>Splitless</i> )
SPE	Extração em fase sólida (do inglês <i>Solid-Phase Extraction</i> )
SPME	Microextração em fase sólida (do inglês <i>Solid-Phase Microextraction</i> )
$t_M$	Tempo Morto
Tol	Tolueno
$t_R$	Tempo de retenção (min)
$t_R'$	Tempo de retenção relativo
UE	União Europeia
$\mu$ LD	Microdessorção Líquida (do inglês <i>Microliquid Desorption</i> )
v/v	Volume por volume
Vdc	Corrente contínua

# 1. Introdução

## 1.1. Surgimento e popularização dos pesticidas

No passado, muitas comunidades enfrentavam uma vida dura e difícil no meio rural, onde o seu dia-a-dia era preenchido pela prática agrícola tradicional e criação de gado. O solo era pobre e as técnicas agrícolas rudimentares, resultando frequentemente numa produção limitada, ou até mesmo insuficiente para a subsistência da própria família [1].

No entanto, com o contínuo crescimento da população e a revolução industrial, houve a necessidade de aumentar a produção para dar resposta à elevada procura. Este aumento de produção implicava que o setor agrícola se adaptasse e que desenvolvesse novas formas de enfrentar dificuldades relacionadas com as pragas e o clima. Surge, assim, a agricultura moderna, caracterizada pela mecanização e pela produção em larga escala, focada na comercialização e no lucro. Para além da implementação de maquinaria houve também a motivação da utilização de agroquímicos, como fertilizantes e pesticidas, com o intuito de aumentar a produção e ajudar a combater, repelir e controlar pragas [1-3]. Estes agroquímicos permitiram melhorar o desempenho agrícola, evitando perdas não só a nível da produção como também nas etapas de processamento e armazenamento dos alimentos. Para além da sua utilização no setor agrícola, os pesticidas podem também ser usados em ambientes domésticos, no controlo de mosquitos, assim como a nível veterinário no controlo de ácaros e moscas do gado [2-4].

Apesar da abrupta popularização da utilização de pesticidas sintéticos durante a industrialização, a temática relativa ao controlo de pragas provém dos tempos antigos [3]. A primeira utilização de pesticidas remete para a Roma antiga, onde era comum a queima de enxofre para matar as pragas [4]. Produtos químicos compostos por metais como o arsénio, chumbo e mercúrio, também foram usados até ao século XX, ficando conhecidos como os pesticidas de primeira geração, usados antes de 1940 [3, 5]. Contudo, devido à sua elevada toxicidade caíram em desuso e passaram a ser utilizados os pesticidas de segunda geração, nomeadamente os agroquímicos orgânicos sintéticos [3]. Estes foram implementados no século XX, época onde se deu um grande avanço científico na indústria química, com a criação de armas químicas para a 2ª Guerra Mundial. Com o fim dos conflitos, esta área decidiu aplicar o seu conhecimento no setor agrícola, permitindo a produção de pesticidas de alta eficiência com baixos custos, como é o exemplo do DDT (diclorodifeniltricloroetano), um pesticida organoclorado largamente usado [3, 5].

Contudo, o recorrente aumento populacional levou à utilização indiscriminada destes compostos químicos, por parte dos agricultores, sem antecipar as futuras consequências para o meio ambiente e para a saúde humana [3]. A descoberta dos efeitos secundários associados à utilização destes agroquímicos provocou um sentimento de insegurança à população, impondo a implementação de normas que regulassem a gestão e utilização destes compostos [3].

A nível mundial (Figura 1.1), observa-se uma crescente utilização de pesticidas nas últimas três décadas, passando de um valor inferior a 2 milhões de toneladas para aproximadamente 3,5 milhões de toneladas em 2022, o que corresponde a um aumento de aproximadamente 75 %. Os inseticidas são o 2º tipo de pesticidas mais utilizado, sofrendo um aumento de aproximadamente 40 %. É possível observar um aumento constante de todas as categorias, refletindo o crescente uso de pesticidas na agricultura, eventualmente associados ao aumento da procura no setor alimentar [6].

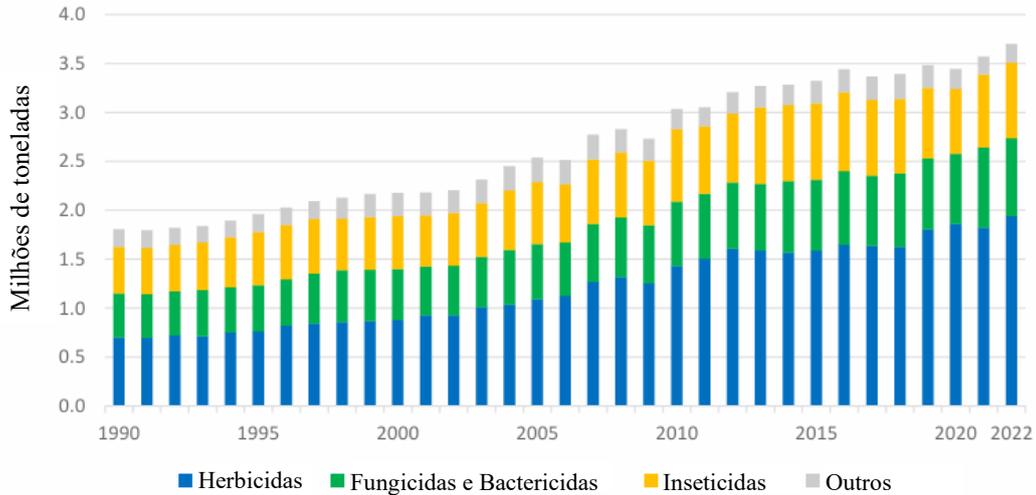


Figura 1.1- Utilização das diferentes categorias de pesticidas a nível mundial; adaptado de [6].

Em Portugal (Figura 1.2), observou-se um aumento da utilização de pesticidas entre 1990-2004, possivelmente associada à modernização do setor agrícola nacional, na qual foi implementado o uso intensivo de produtos químicos com o intuito de maximizar a produção agrícola. Esta modernização poderá, por sua vez, estar vinculada à implementação da Política Agrícola Comum (PAC), tipicamente aplicada a todos os países da União Europeia (UE), conforme foi o caso de Portugal após a sua entrada em 1986 [7-9].

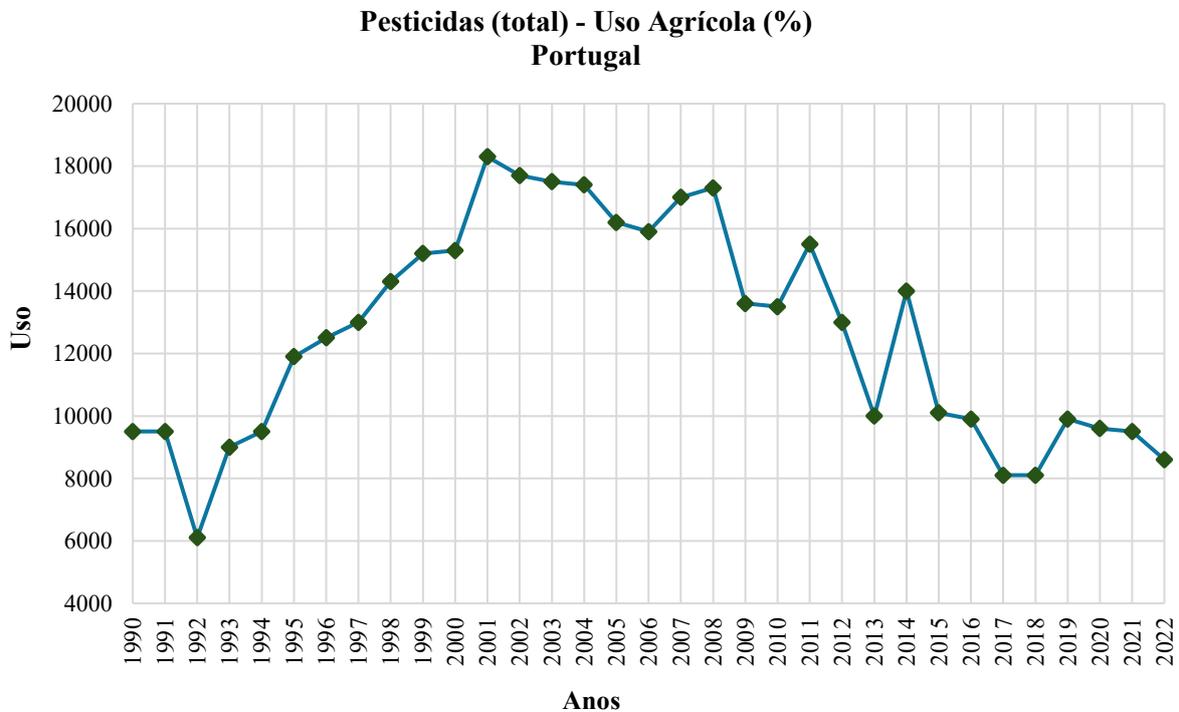


Figura 1.2- Utilização de pesticidas em Portugal entre 1990-2022; adaptado de [10].

A partir de 2004 é notória uma queda, com ligeiras oscilações, que podem estar relacionadas com a introdução de regulamentações, alterações sazonais e condições climáticas específicas. E, a partir de 2011 observamos uma queda mais acentuada, com uma oscilação em 2014. Esta descida poderá estar relacionada com a implementação de leis mais rigorosas da UE, como é o caso do Regulamento (CE) 1107/2009 que restringiu a comercialização de diversos pesticidas permitindo a utilização apenas dos mais seguros e a Diretiva (CE) 2009/128 do Parlamento Europeu e do Conselho que impulsionou a adoção de práticas mais sustentáveis no uso de pesticidas [11, 12]. Por fim, em 2020, coincidente com a altura em que a Comissão Europeia criou a estratégia “Farm to Fork”, um pacto ecológico europeu, que visa reduzir 50 % do uso de pesticidas até 2030, observa-se uma tendência de diminuição no uso de pesticidas em Portugal [13]. Convém, porém, destacar que os valores atingidos em 2022 continuam superiores aos verificados em 1992.

Posto isto, apesar da implementação destas políticas, direcionadas para a redução da utilização de pesticidas, a sua utilização a nível mundial continua a aumentar, sobretudo nos países com elevada atividade agrícola [2].

## 1.2. A segunda geração de pesticidas: O surgimento dos OPs

Como mencionado anteriormente, após a segunda Guerra Mundial, popularizou-se a utilização de pesticidas sintéticos. A primeira classe de pesticidas a surgir foram os organoclorados (OCs, do inglês *organochlorine pesticides*), onde se integra o DDT. Por terem sido implementados numa época de escassez de alimento e, devido à sua elevada eficácia, os OCs proporcionaram à sociedade a oportunidade de combater a fome acabando por gerar uma falsa sensação de segurança [3]. Esta categoria de pesticidas apresenta elevada estabilidade e persistência no meio ambiente, facilitando a bioacumulação e tornando o processo de degradação deste grupo desafiante [14, 15]. A sua elevada toxicidade, trouxe consequências não só para os insetos como também para os seres humanos. Para além disso, foi ainda descoberto que estes compostos se bioacumulavam facilmente no tecido adiposo, afetando o sistema nervoso e alterando as características eletrofisiológicas das membranas [2, 5]. Esta ameaça para o equilíbrio do ecossistema fez com que os OCs fossem proibidos em diversos países [3, 15].

Após esta proibição, os pesticidas organofosforados (OPs, do inglês *organophosphorus pesticides*) surgem com grande influência, sendo alguns exemplos, o malatião, diazião e o clorpirifos [2, 15]. Embora os OPs sejam menos persistentes que os OCs, estes apresentam maior toxicidade, podendo, em alguns casos, apresentar uma toxicidade aguda para os seres humanos [14]. A exposição aos OPs pode ocorrer de forma acidental ou não, resultando em sintomas como ataques de pânico, cólicas, tonturas, deficiência visual, náuseas, dores de cabeça. A exposição prolongada, pode originar casos de toxicidade crónica manifestando-se por sintomas como perturbações sanguíneas e nervosas e alterações genéticas [14]. A intoxicação por OPs é atualmente considerada uma das causas mais comuns de intoxicação por pesticidas a nível mundial [5].

## 1.3. Classificação e estabilidade ambiental dos pesticidas

Os pesticidas podem ter origem química sintética ou biológica e ser classificados de diferentes formas, como pelo nível de toxicidade, modo de ação ou ainda pela composição química. Tendo em conta o modo de ação, estes podem ser agrupados em inseticidas (para repelir ou eliminar insetos), herbicidas (para eliminar ervas-daninhas), fungicidas (para prevenir o desenvolvimento de fungos), rodenticidas

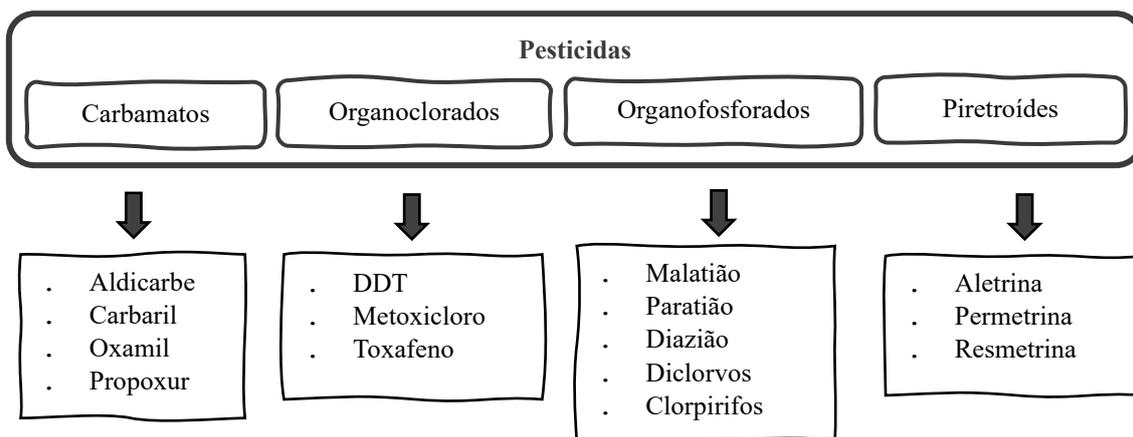


Figura 1.3- Classificação comum dos pesticidas tendo em conta a composição química; adaptado de [14].

(para repelir ou eliminar roedores), entre outros. No caso da composição química, como ilustra a Figura 1.3, podem ser classificados em carbamatos, OCs, OPs e piretróides [2, 3, 14].

Uma das grandes problemáticas associada à aplicação de pesticidas consiste na sua “ação não direcionada”, ou seja, quando aplicado apenas 1 % atinge o organismo alvo enquanto a restante porção permanece no meio ambiente. Após aplicação, os pesticidas podem persistir ativamente no solo, na água e no ar e levar à exposição indireta do Homem e de outros organismos através interações ambientais [5]. Um exemplo de organismos não alvo, são os artrópodes que são fortemente afetados por este tipo de compostos, principalmente pelos inseticidas. A morte destes predadores, que desempenham um papel fundamental no controlo das pragas, pode levar a um aumento das pestes e conseqüente necessidade de aplicação de inseticidas nas colheitas [4].

Quando adsorvidos no solo os pesticidas estão suscetíveis a sofrer processos de escoamento superficial, causados pelas chuvas e por processos de irrigação, que podem levar à contaminação direta de águas superficiais como rios, lagos e oceanos [5, 14]. Dependendo da solubilidade dos pesticidas assim como das características do solo, alguns pesticidas podem sofrer processos de infiltração levando também à contaminação da água subterrânea, a principal fonte de água potável [5, 14]. No caso dos OPs, de uma forma geral, apresentam uma elevada adsorção aos solos assim como elevada solubilidade na água [14]. A entrada destes compostos nos recursos aquáticos leva igualmente à contaminação dos organismos lá existentes podendo dar origem a casos de bioacumulação na cadeia alimentar [14].

Neste sentido, verifica-se que a aplicação de pesticidas coloca em risco o equilíbrio do ecossistema, salientando-se o impacto que possa ter na qualidade da água para consumo humano e outros fins.

#### 1.4. Modo de atuação dos OPs

A persistência dos pesticidas no ecossistema e a sua conseqüente entrada na cadeia alimentar é a principal causa de contaminação do ser humano [5]. Grande parte dos casos de contaminação ocorre em setores onde os trabalhadores estão diretamente expostos a este tipo de compostos, nomeadamente, a indústria e o setor agrícola, onde o risco de exposição é significativamente elevado. Os casos de contaminação podem ocorrer durante os processos de mistura, transporte, armazenamento e aplicação destes compostos, bem como de forma acidental, devido a derrames químicos, equipamentos de aplicação e proteção danificados, ou ainda pelo transporte pelo vento durante a pulverização, entre

outros [5]. Os diversos casos de exposição podem ocorrer por diferentes vias de absorção no organismo, como as membranas mucosas, a pele, o trato gastrointestinal ou o sistema respiratório [15].

Nos países subdesenvolvidos, a falta de regulamentação agrava estes casos de intoxicação, contribuindo para as elevadas taxas de morbidade e mortalidade. Contudo, mesmo em países desenvolvidos, o setor agrícola encontra-se vulnerável, em particular devido à não utilização dos equipamentos de proteção pessoal recomendados [15].

No organismo, os OPs interferem com o funcionamento do sistema nervoso através da inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), que é responsável pela degradação da acetilcolina (ACh) após a transmissão do impulso nervoso (Figura 1.4) [4, 14]. Quando a AChE é inibida, ocorre a acumulação de ACh nas sinapses, resultando numa hiperestimulação dos nervos e músculos [4, 14, 15].

Esta ação tóxica pode gerar sintomas como tonturas, náuseas, dores de cabeça, convulsões e, em casos graves, coma ou morte [2, 14]. Os sinais de intoxicação podem também ser desencadeados por disfunções autónomas, como secreção excessiva de glândulas salivares e lacrimais, inibição do reflexo pupilar, tremores, movimentos involuntários e paralisia respiratória. Estes efeitos podem ocorrer tanto em insetos como em mamíferos, incluindo os humanos [4, 15].

A ACh é responsável por transmitir o impulso nervoso no sistema cerebral, esquelético e muscular. Após a transmissão do impulso nervoso, a ACh é hidrolisada pela AChE, dando origem à colina e acetilcoenzima A (acetil CoA). Esta etapa de hidrólise é essencial de modo a evitar a sobre estimulação do sistema nervoso [4, 14].

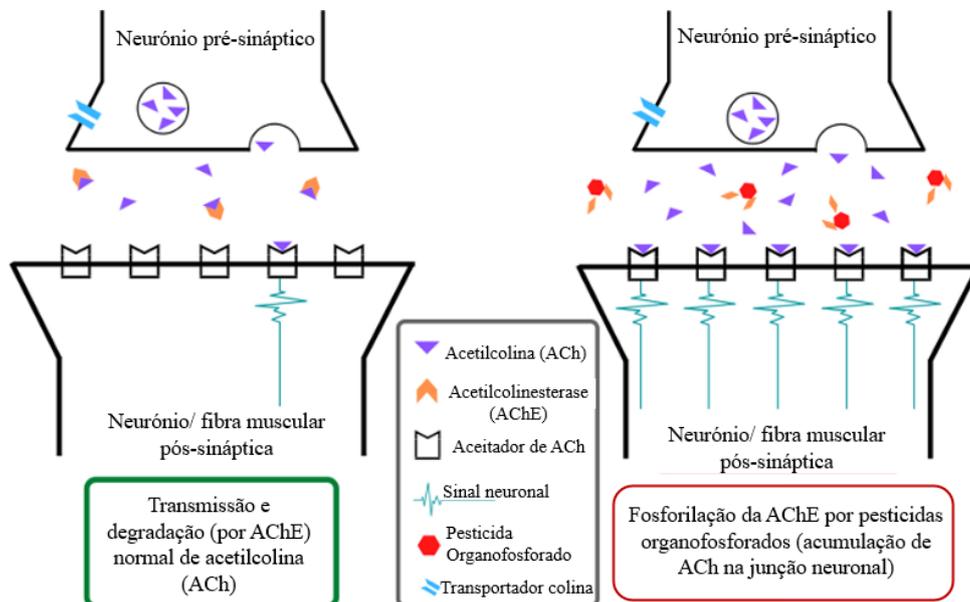


Figura 1.4- Exposição a pesticidas organofosforados: Interação com a acetilcolina; adaptado de [16].

### 1.5. Classificação dos pesticidas pela OMS com base na toxicidade

Conforme mencionado anteriormente, os pesticidas podem ser classificados de diversas formas. A Organização Mundial de Saúde (OMS) disponibilizou um documento que fornece um método de classificação que se baseia na toxicidade aguda dos compostos, determinada através de estudos de toxicidade oral e dérmica em ratos. Esta classificação é constituída por categorias que variam de

extremamente perigosas, classe Ia, a pouco perigosas, classe III. E ainda apresentam a categoria U, que se refere a produtos que não apresentam risco agudo significativo [17].

Este método tem por base a dose letal 50,  $DL_{50}$ , estimada pelos testes em animais de laboratório e define a quantidade de pesticida necessário, por via oral ou dérmica, que pode levar à morte de metade da população dos animais testados. Na Tabela 1.1, podemos observar a classificação recomendada pela OMS tendo como base as categorias de risco de toxicidade aguda do Sistema de Harmonização Global (GHS, do inglês *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals*) [17, 18].

Tabela 1.1- Classificação de pesticidas recomendada pela OMS; retirado de [17].

Classificação	$DL_{50}$ em ratos (mg/kg peso corporal)	
	Oral	Dérmica
<b>Ia</b> Extremamente perigoso	< 5	< 50
<b>Ib</b> Altamente perigosos	5 - 50	50 - 200
<b>II</b> Moderadamente perigoso	50 - 2000	200 - 2000
<b>III</b> Ligeiramente perigoso	> 2000	
<b>U</b> Improvável que apresente perigo agudo	$\geq 5000$	

## 1.6. Pesticidas organofosforados

Os OPs são compostos amplamente utilizados no controlo de pragas agrícolas devido à sua eficácia e versatilidade. Na Figura 1.5, é possível observar a estrutura química base desta classe de pesticidas. A principal característica desta estrutura é a presença de um átomo de fósforo (P) central, que estabelece ligações com diferentes grupos funcionais substituintes, R1 e R2, que podem ser grupos aril (compostos aromáticos) ou alquil (cadeias carbonadas (C) e átomos de hidrogénio (H)). Adicionalmente, um átomo de oxigénio (O) ou enxofre (S) pode também estar diretamente ligado ao fósforo, originando compostos fosfatos ou fosfotioatos, respetivamente. Por fim, na estrutura está também presente um grupo de saída (X), também conhecido como grupo rejeitado (por ser tipicamente libertado após o processo de hidrólise deste grupo de pesticidas), que pode ser um grupo halogenado, alifático, aromático ou heterocíclico. Essa diversidade estrutural contribui para as distintas propriedades químicas e biológicas destes compostos [19].

Apesar da utilização de muitos dos OPs ser atualmente proibida, a sua excessiva utilização, no passado, deixou marcas significativas no meio ambiente. Estudos demonstram que é possível detetar estes compostos no meio ambiente, mesmo muito tempo após o término da sua aplicação, evidenciando a sua persistência. Embora este grupo de pesticidas tende a apresentar uma moderada persistência no solo, a sua deteção nos meios aquáticos próximos a áreas de cultivo é muito comum, sugerindo que fatores

como as condições climáticas e o tipo de solo possam influenciar a sua degradação e mobilidade. Essa persistência e mobilidade dos OPs reforçam a importância de uma monitorização contínua e do desenvolvimento de novas estratégias que possibilitem monitorizar a sua presença em diferentes matrizes ambientais e mitigar os potenciais riscos associados ao meio ambiente e à saúde pública [14, 20].

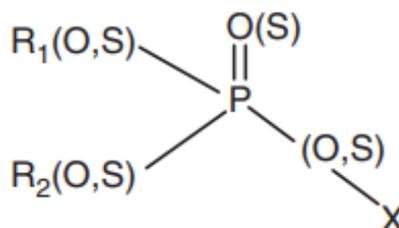


Figura 1.5- Estrutura química dos OPs; adaptado de [19].

De entre os diversos OPs neste projeto destacam-se cinco, nomeadamente o etoprofos, diazião, metil-paratião, malatião e clorpirifos. A ação, polaridade e situação regulamentar desses compostos podem ser consultadas na Tabela 1.2, que inclui também as datas em que a Comissão Europeia determinou a retirada dos pesticidas estudados da lista de substâncias ativas autorizadas, devido aos riscos para a saúde humana.

Tabela 1.2- Informação sobre a ação, propriedades e regulamentação dos cinco OPs em estudo.

Composto	Ação	Log K <sub>ow</sub> [21]	Proibição Pela UE**	Legislação
<b>Etoprofos</b>	Inseticida e nematocida	3,59	Proibido a 2019	[22]
<b>Diazião</b>	Inseticida, nematocida e acaricida	3,81	Proibido a 2007	[23]
<b>Metil-paratião</b>	Inseticida	2,86	Proibido a 2003	[24]
<b>Malatião</b>	Inseticida e acaricida	2,36	Utilização controlada a 2007	[25]
<b>Clorpirifos</b>	Inseticida, nematocida e acaricida	4,70	Proibido a 2020	[26]

### 1.6.1. Etoprofos

O analito *O-ethyl S,S-dipropyl phosphorodithioate*, conhecido como etoprofos (C<sub>8</sub>H<sub>19</sub>O<sub>2</sub>PS<sub>2</sub>), apresenta ação inseticida e nematocida, amplamente utilizado no cultivo de batata e, como inseticida, no cultivo do milho (Figura 1.6) [29, 30].

O etoprofos é altamente tóxico para a saúde humana, apresentando como principais vias de exposição oral, dérmica e respiratória e, tal como os outros OPs, este analito inibe a enzima AChE [27, 28]. A

intoxicação por etoprofos afeta predominantemente o sistema nervoso central, sistema respiratório e o sistema cardiovascular. Os sintomas de intoxicação podem incluir náuseas, dificuldade respiratória, e convulsões; em casos mais graves, pode causar paralisia muscular e falência respiratória [29, 30]. A sua excreção ocorre pela urina [28].

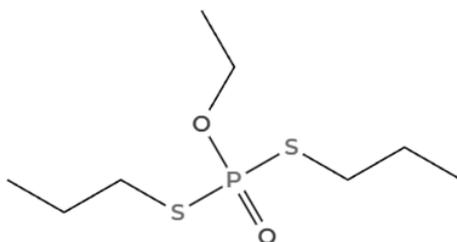


Figura 1.6- Estrutura química do etoprofos.

O etoprofos apresenta uma boa estabilidade tanto no solo como na água, sendo a sua decomposição influenciada por fatores como temperatura, pH e a matéria orgânica presente nesse meio. No solo, o tempo de semi-vida varia entre 4 e 12 semanas, sendo mais persistente nos solos ricos em matéria orgânica e sob temperaturas mais baixas [27]. Na água, apresenta um tempo de semi-vida de 2 a 4 semanas, muito influenciável pelo pH e pela exposição à luz solar [29]. Em ambos os meios, a presença de matéria orgânica pode reduzir a sua estabilidade, trazendo consequências prejudiciais para os organismos aquáticos e terrestres [27, 29]

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o etoprofos é classificado como um pesticida de classe II, ou seja, moderadamente tóxico para os seres humanos [17].

### 1.6.2. Diazinão

O *O-O-diethyl O-(2-isopropyl-6-methyl-4 pyrimidinyl)phosphorothioate*, ou diazião ( $C_{12}H_{21}N_2O_3PS$ ), é um OPs de origem sintética, com ação inseticida, acaricida e nematocida (Figura 1.7) [31, 32]. Registrado pela primeira vez em 1956, nos Estados Unidos da América (EUA), o diazião é amplamente utilizado na agricultura, no cultivo de frutos vermelhos, nozes e nectarinas. Além disso, é empregue no uso doméstico para o controlo de insetos em casas, nos jardins e em animais de estimação, bem como em tratamento veterinário contra carrapatos e pragas do gado [31-33].

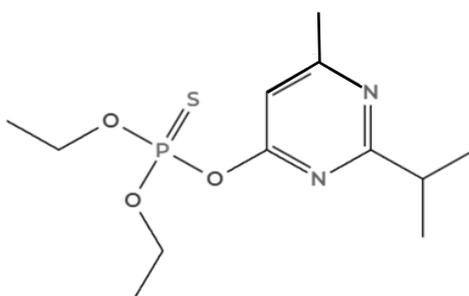


Figura 1.7- Estrutura química do diazião.

A exposição ao diazião ocorre principalmente pela ingestão de alimentos contaminados, sendo absorvido pelo trato gastrointestinal, distribuído pelo organismo e metabolizado no fígado. A exposição

ocupacional, por sua vez, ocorre predominantemente por contacto dérmico [34]. No organismo, o diazião é transformado numa molécula chamada diazoxon, que interfere com o funcionamento do sistema nervoso, ao inibir a enzima AChE, podendo levar à morte de insetos e mamíferos [31, 35, 36].

Os efeitos da contaminação incluem danos ao fígado, rins, coração, intestinos, pâncreas e pulmões. Os sintomas, semelhantes aos restantes pesticidas do mesmo grupo, incluem dor de cabeça, sudorese, salivacão excessiva e sonolência. Em exposições mais severas, pode ocorrer arritmias (frequência cardíaca anormal), fraqueza muscular, espasmos musculares e congestão pulmonar [31, 34]. O diazião é rapidamente excretado do corpo, na forma de dois metabolitos principais pela urina [32].

A estabilidade e o tempo de semi-vida do diazião variam de acordo com as condições ambientais. Na água, sob pH neutro, apresenta um tempo de semi-vida entre 2 e 4 semanas [36]. No solo, o tempo de semi-vida varia entre as 2 e as 10 semanas, sendo mais persistente em solos ricos em matéria orgânica e em temperaturas mais baixas. Desta forma, a sua decomposição depende de fatores como o pH, a temperatura e o tipo de solo [32, 33].

Devido à sua toxicidade elevada e ampla utilização, o diazião está associado frequentemente a casos de envenenamento. Por isso, a OMS classifica este pesticida como moderadamente perigoso, pertencente à categoria II [17, 35].

### 1.6.3. Metil-Paratião

O composto *O-O-dimethyl O-(4-nitrophenyl) phosphorothioate* conhecido como metil-paratião ( $C_8H_{10}NO_5PS$ ), é um inseticida aplicado por pulverização, amplamente utilizado no cultivo de algodão, cereais, vegetais, soja e fruta (Figura 1.8) [37, 38].

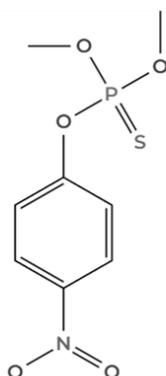


Figura 1.8- Estrutura química do metil-paratião.

O metil-paratião é extremamente tóxico para os seres humanos e pode ser absorvido por inalação, exposição dérmica ou ingestão. Acaba por afetar órgão vitais como o coração, sistema nervoso, fígado, rins e ainda os olhos, pele, sistema respiratório e sistema cardiovascular [39]. Os sintomas incluem náuseas, vômito, diarreia, salivacão extrema, bradicardia, convulsões e, em casos muito graves, podem ocorrer danos no fígado e rins, disfunções neurológicas permanentes ou até levar à morte [39, 40]. No caso de grávidas, a exposição prolongada pode afetar o desenvolvimento fetal [41]. A excreção do metil-paratião ocorre pela urina, dentro de 24 horas [38, 39].

A contaminação ambiental pelo metil-paratião está associada à pulverização, que facilita a sua deposição na atmosfera e lixiviação para o solo e corpos de água. Estes processos apresentam riscos tanto para a saúde pública como para o meio ambiente [41]. Na água, o metil-paratião apresenta um tempo de semi-vida de 7 a 14 dias, sendo a sua estabilidade fortemente influenciada pelo pH e temperatura. Em condições de pH alcalino ou temperaturas elevadas, a sua estabilidade é reduzida [38-40]. No solo, o metil-paratião apresenta uma maior estabilidade, que varia entre 10 e 60 dias, dependente de fatores como o tipo de solo, humidade e temperatura [37]. Em solos mais secos e ácidos, persiste por períodos mais longos, aumentando o risco de contaminação ambiental [37, 39].

Desta forma, a OMS classifica o metil-paratião como um pesticida de classe I, o que significa que este analito é considerado extremamente tóxico para a saúde pública [17].

#### 1.6.4. Malatião

O composto *S*-(1,2-dicarbethoxyethyl) *O,O*-dimethyl dithiophosphate ou malatião ( $C_{10}H_{19}O_6PS_2$ ), é um pesticida com ação inseticida e acaricida (Figura 1.9). Registado pela primeira vez nos EUA, em 1956, este analito é amplamente utilizado na agricultura para o cultivo de frutas e legumes, na veterinária para o controlo de pestes de gado e em uso doméstico no controlo de piolhos humanos e pulgas nos animais de estimação [42, 43].

A exposição a este analito pode ocorrer por contacto dérmico, ingestão ou inalação [42, 44]. A intoxicação por malatião pode gerar sintomas neurológicos, como dores de cabeça, convulsões e dificuldades de coordenação; sintomas gastrointestinais, como náuseas e vômitos; sintomas respiratórios, musculares e cutâneos. Em casos mais graves, pode ocorrer a depressão do sistema nervoso central, gerar convulsões, coma ou até levar à morte, devido à alteração da função muscular pela inibição da colinesterase [42, 44, 45]. O malatião é excretado como metabolito pela urina [43].

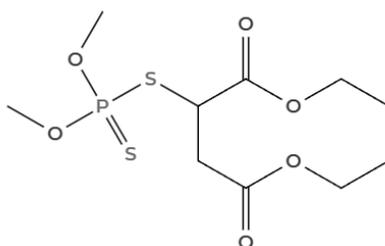


Figura 1.9- Estrutura química do malatião.

Após a sua aplicação, o malatião pode se depositar no solo, plantas, água e outras superfícies. No solo, apresenta um tempo de semi-vida que varia de 1 a 17 dias, dependendo das condições de temperatura e humidade. Na água, a sua degradação ocorre mais rapidamente, com um tempo de semi-vida aproximado de 2 dias em pH 8,2 e até 17 dias em pH 6,0 [46, 47]. A sua degradação é fortemente influenciada pela exposição à luz solar e pela temperatura da água, sendo mais curto em ambientes aquáticos mais quentes e sob intensa luz solar [46].

O malatião é classificado como pesticida de classe III pela OMS, ou seja, de baixo risco a moderado para a saúde humana [17].

### 1.6.5. Clorpirifos

O composto *O,O*-Diethyl-*O*-(3,5,6-trichloro-2-pyridinyl)phosphorothioate conhecido como clorpirifos (C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>Cl<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>PS), é um OPs com propriedades inseticidas e acaricidas (Figura 1.10). É amplamente utilizado no controlo de pragas agrícolas, como no cultivo de algodão, cana-de-açúcar, legumes cereais, entre outros, além de aplicações domésticas, como no controlo de térmitas, de bichos de prata e em coleiras anti pulgas. Também é empregue no veterinário, no controlo de carraças do gado [48, 49]. O

clorpirifos está disponível em formulações granulares, mas é frequentemente misturado com líquidos oleosos antes de ser aplicado em plantações ou animais [49, 50].

No meio ambiente, a degradação do clorpirifos resulta na formação do composto 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP). Este subproduto apresenta menor partição no solo e na água do que o clorpirifos, mas pode permanecer em escoamentos por períodos de tempo mais longos [51, 52].

As principais fontes de exposição ao clorpirifos são absorção cutânea, inalação e ingestão, afetando predominantemente o sistema nervoso e o sistema respiratório. Os sintomas incluem tonturas e paralisia, podendo, em casos graves, levar à morte. Durante a gravidez, a intoxicação por clorpirifos pode afetar tanto a mãe como o feto ou recém-nascido, causando complicações graves, como eclâmpsia, caracterizada por convulsões, confusão mental e perda de consciência [49, 52]. A excreção do clorpirifos ocorre principalmente pela urina, cerca de 80 - 90 %, enquanto o restante é eliminado pelas fezes [52].

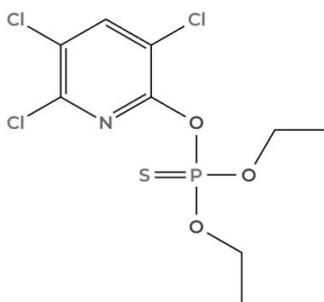


Figura 1.10- Estrutura química do clorpirifos.

O tempo de semi-vida do clorpirifos varia dependendo das condições ambientais como a temperatura e o pH. Na água, varia entre 1 e 2 semanas, sendo a sua degradação acelerada sob exposição à luz solar [50]. No solo, o tempo de semi-vida varia de 30 a 150 dias, dependendo da humidade e da temperatura. Em solos húmidos e quentes, a biodegradação microbiana contribui significativamente para a sua decomposição [48]. O clorpirifos apresenta alta adsorção ao solo, dificultando a sua lixiviação, mas facilitando a sua propagação para águas subterrâneas quando presentes em solos arenosos [51].

Dado o perigo moderado que o clorpirifos representa para a saúde humana, a OMS, classifica este composto como um pesticida de classe II [17].

## 1.7. Preparação de amostras

### 1.7.1. Monitorização vestigial dos OPs

A monitorização vestigial dos OPs é de extrema importância devido ao seu impacto na saúde humana e no ambiente. Mesmo em concentrações residuais, estes compostos podem representar sérios riscos, acumulando-se ao longo da cadeia alimentar e desencadeando efeitos tóxicos significativos. A deteção precisa e confiável vestigial de OPs é essencial para garantir a segurança, avaliar a contaminação ambiental e desenvolver estratégias de mitigação eficazes [4, 5].

A relevância dessa monitorização é destacada pela Diretiva (UE) 2020/2184, que estabelece limites rigorosos para a presença de pesticidas, incluindo OPs, em águas destinadas ao consumo humano. Esta diretiva reflete a preocupação pela presença de substâncias tóxicas em fontes de água potável, estipulando que a concentração máxima permitida de pesticidas individuais não deve ultrapassar 0,1 µg/L, enquanto o limite para o total de pesticidas é de 0,5 µg/L. Além disso, a norma também considera as substâncias ativas dos pesticidas, os seus metabolitos, produtos de degradação e de reação. O objetivo desta diretiva é garantir que a água de consumo humano seja segura, protegendo a saúde pública e o meio ambiente [53].

Uma outra diretiva, relativa à regulamentação das águas superficiais em Portugal, o Decreto-Lei n.º 236/98, de 1 de agosto, estabelece limites específicos para presença de pesticidas, tanto individuais como quanto à soma total dos mesmos. Neste é fixado o limite de 0,5 µg/L para pesticidas individuais e de 2,5 µg/L para o somatório dos pesticidas. Este Decreto-Lei tem como objetivo proteger os ecossistemas aquáticos e garantir a qualidade das águas superficiais utilizadas para diferentes fins, entre os quais as águas de rega e águas para suporte de vida aquícola [54].

No contexto laboratorial, a preparação de amostras é crucial para o sucesso das análises subsequentes, com impacto direto na identificação e quantificação de compostos como os OPs, especialmente em concentrações vestigiais [55, 56]. Para análises por GC, é necessário garantir que apenas substâncias voláteis e semi-voláteis, além de não termolábeis, sejam introduzidas no sistema, otimizando a sensibilidade e a especificidade da análise. A aplicação dessa técnica instrumental, em conjunto com os requisitos estabelecidos pela Diretiva e Decreto-Lei mencionados anteriormente, permitirá assegurar que as amostras de água analisadas atendam aos rigorosos critérios de qualidade, minimizando os riscos à saúde humana associados à presença de pesticidas nessa matriz [57, 58].

### 1.7.2. Técnicas de extração

Nas análises laboratoriais, as técnicas de extração e pré-concentração são fundamentais para a deteção de analitos em matrizes complexas. Durante a preparação de amostras podem ser utilizados métodos clássicos ou miniaturizados. A extração líquido-líquido (LLE) é uma técnica clássica, versátil e amplamente utilizada, que permite extrair compostos com polaridades distintas em matrizes aquosas. Baseia-se na partição dos analitos, que se distribuem de forma seletiva entre duas fases, de acordo com a sua afinidade e solubilidade em cada solvente. Apesar da sua eficiência e comum aplicação em análises de rotina, apresenta desvantagens como a utilização de grandes volumes de solventes e ser um processo moroso, de difícil automatização [55, 59].

A extração em fase sólida (SPE) trata-se de uma técnica mais recente que utiliza cartuchos ou discos que contêm materiais sólidos, como polímeros, que permitem extrair e reter seletivamente os analitos com interesse presentes numa solução líquida. O princípio desta técnica baseia-se na sorção dos analitos

à superfície do material sólido, seguida pela eluição seletiva utilizando solventes adequados. Esta técnica oferece várias vantagens, como a redução significativa do uso de solventes e a automatização do processo. Além disso, a SPE proporciona maior seletividade e eficiência na separação, permitindo a concentração dos analitos com interesse e remoção de interferentes da matriz. Em comparação com a LLE, a SPE utiliza menores quantidades de solventes orgânicos e requer um menor tempo de extração. Contudo, a principal limitação da SPE é a necessidade de volumes maiores de amostra, o que nem sempre é viável [55, 56, 59].

Embora as técnicas de extração tradicionais anteriormente referidas ainda sejam amplamente utilizadas, as suas limitações impulsionaram o desenvolvimento de métodos mais modernos e sustentáveis. Neste sentido, nas últimas três décadas, têm vindo a ser desenvolvidas técnicas de miniaturização (Figura 1.11) como uma alternativa simplificada e eficiente. Estas técnicas destacam-se pela simplicidade, permitindo realizar simultaneamente, a extração e pré-concentração de amostras, isolando os compostos com interesse e aumentando a sua concentração. Além disso, enquadram-se nos princípios da química verde, devido à utilização de volumes reduzidos ou até mesmo à isenção de solvente orgânico [55, 59]. Graças a essas vantagens, as técnicas de microextração têm vindo a ser amplamente aplicadas em análise vestigial, tornando viável a utilização de pequenos volumes de amostras e garantindo elevada seletividade e sensibilidade, mesmo em concentrações muito baixas [60, 61].

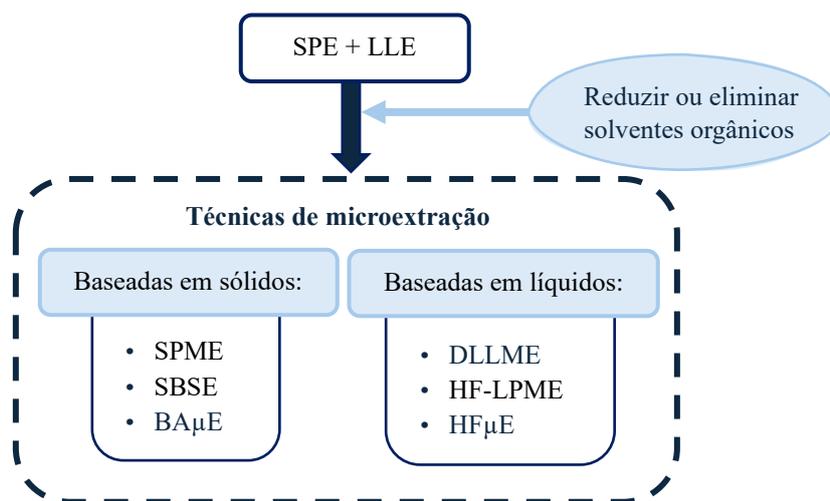


Figura 1.11- Evolução das técnicas de extração clássicas para as técnicas miniaturizadas.

Consoante o tipo de material utilizados para extrair os analitos podemos subdividir as técnicas de microextração em dois grandes grupos: as técnicas baseadas em sólidos e as técnicas baseadas em líquidos [56, 57].

As técnicas baseadas em sólidos, como o nome indica, utilizam material sólido (como polímeros) para capturar por sorção os analitos presentes na amostra. Os analitos sorvem à superfície sólida e são posteriormente dessorvidos para análise [57, 58].

A microextração em fase sólida (SPME), utiliza uma fibra de sílica fundida com revestimento polimérico, no qual são adsorvidos os analitos presentes na matriz. A fibra, quando exposta à amostra, que pode ser líquida ou gasosa, extrai os compostos por sorção. Posteriormente, a fibra é transferida para um sistema de análise, como um cromatógrafo em fase gasosa, onde ocorre dessorção e introdução dos analitos diretamente no sistema. Esta técnica amplamente utilizada em análise ambiental, especialmente para a microextração de compostos orgânicos voláteis em amostras aquosas. Embora

eficaz, esta técnica requer grandes volumes de amostra e apresenta sorção limitativa devido à saturação da fase sorvente, o que limita o processo extrativo [61, 62].

A extração sortiva em barra de agitação (SBSE), é outro exemplo de uma técnica baseada em sólidos, que utiliza uma barra de agitação magnética revestida com uma fase adsorvente sólida geralmente polidimetilsiloxano (PDMS), utilizada para extrair os analitos [55, 58, 62]. Durante este processo, a barra revestida com a fase extratora é colocada numa amostra líquida, onde os analitos se adsorvem ao material sólido polimérico [57]. Após a extração, a barra é removida e os analitos podem ser introduzidos diretamente no equipamento analítico por dessorção térmica ou líquida. Esta técnica revelou-se muito sensível para a análise vestigial em matrizes ambientais, apresentando a vantagem de utilizar uma quantidade insignificante ou isenta de solventes orgânicos [55, 57, 62]. Contudo, a SBSE apresenta uma grande limitação, a dependência por um único polímero de revestimento, comercialmente disponível, o PDMS. Por ser apolar, esse polímero permite a extração eficiente de compostos apolares ou fracamente polares, evidenciando limitações para extrair os compostos mais polares [55, 62].

Um bom exemplo de uma técnica inovadora é a microextração adsortiva em barra (BA $\mu$ E) que combina uma fase sólida, nomeadamente um dispositivo cilíndrico em polipropileno (PP) no qual é fixada uma fase extratora, com duas fases líquidas imiscíveis, a matriz aquosa e um solvente orgânico previamente selecionado [62, 63]. A fase sólida serve como suporte para a extração dos analitos, que são posteriormente dessorvidos e analisados. Uma das suas principais vantagens consiste na diversidade de fases extradoras disponíveis, permitindo a extração de analitos com diferentes polaridades presentes em matrizes complexas. Além disso, é uma técnica simples, de baixo custo e alinhada com os princípios da química verde [61, 64].

Por sua vez, as técnicas baseadas em líquidos envolvem a partição dos analitos entre duas fases líquidas imiscíveis. Esta partição ocorre com base na diferente solubilidade dos analitos nas duas fases, e o solvente contendo os analitos é então separado e analisado. A microextração por dispersão líquido-líquido (DLLME), é uma técnica em que um pequeno volume de solvente orgânico é disperso na amostra líquida, permitindo a extração dos analitos. Após a extração, as fases são separadas por centrifugação, e o solvente contendo os analitos é analisado. Apesar de ocorrer um baixo consumo de solventes esta técnica apresenta uma grande desvantagem, não sensível para a análise vestigial. Isto porque este processo extrativo baseia-se no equilíbrio de partição entre a amostra líquida e o solvente de extração. Assim sendo, em amostras vestigiais, o pequeno volume de solvente utilizado pode não ser suficiente para extrair quantidade detetáveis de analitos com interesse [63].

Outra técnica de microextração desenvolvida é a microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME), uma técnica simples, de baixo custo e com um reduzido impacto ambiental. Esta técnica tem por base o funcionamento da microextração em fase líquida (LPME), que se baseia na transferência seletiva de analitos de uma matriz líquida, para um solvente orgânico. No caso da HF-LPME, é utilizada uma fibra oca (HF) com uma membrana interna porosa e hidrofóbica na qual é colocado um solvente orgânico, impregnando os poros e preenchendo o interior da membrana. Quando em contacto com a matriz, decorre a transferência seletiva e concentração dos analitos para o interior da fibra. Essa separação ocorre devido à afinidade dos analitos alvo ao solvente, que deve ser selecionado com base nas características, dos analitos em estudo. Esta é uma técnica versátil, que utiliza uma pequena quantidade de solventes orgânicos, muito eficaz em matrizes líquidas, como águas [63, 65, 66].

Embora eficaz, esta técnica requer o uso de uma seringa para introduzir e remover o solvente orgânico, e como consequência requer um utilizador experiente. Outro desafio é o facto da fibra permanecer imóvel durante todo o processo de extração. Uma vez que a extração ocorre principalmente por difusão,

a falta de movimento limita a interação entre a amostra e o solvente, presente no interior da fibra, reduzindo a eficiência extrativa [66].

A Tabela 1.3 resume as vantagens e desvantagens das técnicas de extração discutidas anteriormente.

Tabela 1.3- Resumo das vantagens e desvantagens das técnicas de extração.

Técnica Extração	Vantagens	Desvantagens
<b>SPE</b> (Extração em fase sólida)	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Usa menos solvente que LLE</li> <li>. Seletividade (possibilidade de escolher sorvente)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Grandes volumes de amostra</li> <li>. Saturação do sorvente</li> </ul>
<b>LLE</b> (Extração líquido-líquido)	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Eficiência de separação (polaridade)</li> <li>. Simples</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Morosa,</li> <li>. Difícil de automatizar</li> <li>. Grande consumo de solventes</li> <li>. Baixa sensibilidade</li> </ul>
<b>SPME</b> (Microextração em fase sólida)	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Rápida e simples,</li> <li>. Pouco solvente,</li> <li>. Automatizável</li> <li>. Reutilizável (fibras)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Sorvente limitado</li> <li>. Conhecimento do operador</li> <li>. Custo elevado</li> </ul>
<b>SBSE</b> (Extração sortiva com barra de agitação)	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Pouco solvente</li> <li>. Alta eficiência de extração</li> <li>. Automatizável</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Limitado ao polímero PDMS (compostos apolares)</li> <li>. Custo elevado</li> </ul>
<b>BA<math>\mu</math>E</b> (Microextração adsortiva em barra)	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Diversidade de fases extratoras</li> <li>. Pouco solvente</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Possível contaminação do sistema instrumental devido às fases sorventes utilizadas</li> </ul>
<b>DLLME</b> (Microextração por dispersão líquido-líquido)	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Pouco solvente</li> <li>. Simples</li> <li>. Rápida</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Não aplicável a análise vestigial</li> </ul>
<b>HF-LPME</b> (Microextração em fase líquida com fibra oca)	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Seletividade</li> <li>. Baixo consumo de solventes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Utilizador com experiência</li> <li>. Extração limitada</li> </ul>

Para otimizar e simplificar o processo da HF-LPME, foi desenvolvida a microextração em fibra oca (HF $\mu$ E). A sua preparação é feita em laboratório, através do corte manual da fibra e de uma etapa de pré-condicionamento. De seguida, a fibra é colocada diretamente em contacto com o solvente extrator, permitindo assim o preenchimento dos poros presentes na membrana interna. Posteriormente, a fibra é colocada no frasco de amostragem contendo a amostra em estudo, e o processo de microextração decorre por agitação magnética. Durante este processo a fibra flutua na fase dadora, prevenindo desta forma a degradação da membrana extratora. Após a microextração, a fibra é transferida para um *insert* dentro de um *vial* contendo solvente orgânico e, por sonificação, esta liberta o analito em estudo para o solvente selecionado, ficando pronto para análise instrumental (Figura 1.12) [66, 67]. Essa adaptação, conhecida por dessorção líquida numa única etapa (*one LD step*, do inglês *one liquid desorption step*), simplifica o processo de retroextração, aumentando a sua eficiência e facilitando a sua aplicação em análises de rotina [67].

A técnica HF $\mu$ E mostrou-se eficaz na microextração de compostos semi-polares e apolares em concentrações vestigiais, graças à possibilidade de otimizar parâmetros como o solvente e o tempo de

extração, que permite adaptar a técnica ao analito em estudo. Estes dispositivos foram projetados para uso único devido a fatores como o baixo custo associado, à simplicidade e rapidez na preparação, além de garantir que não ocorra contaminação entre amostras [66-68].

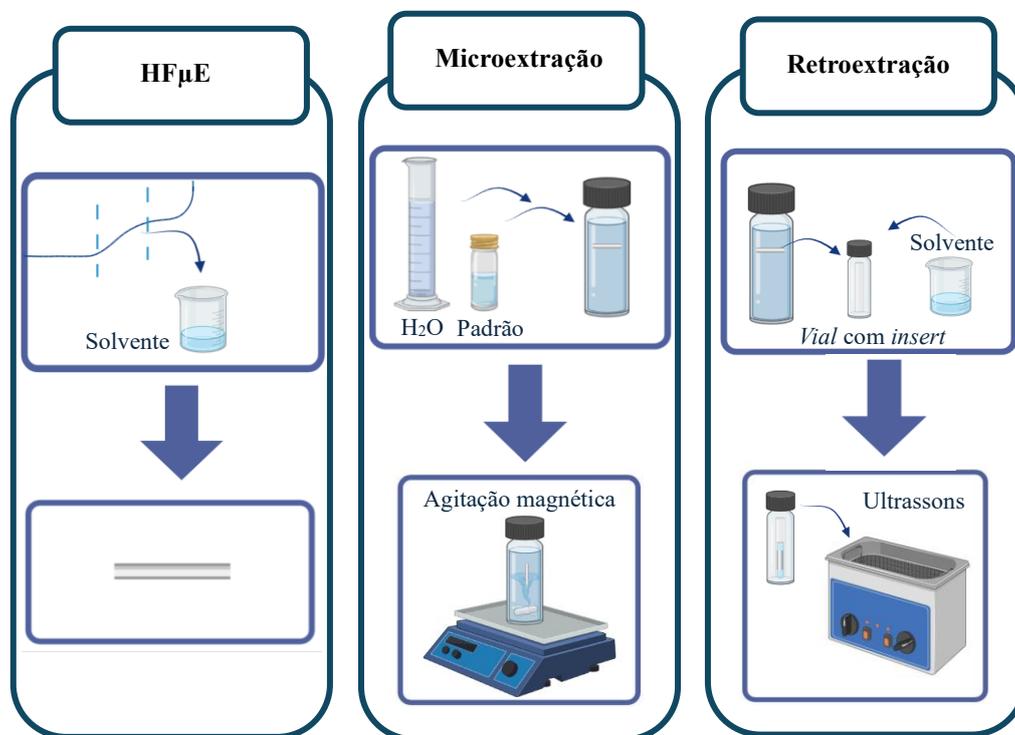


Figura 1.12- Esquematização simplificada da configuração para as duas etapas, microextração e retroextração, dos ensaios HF $\mu$ E-LD realizados neste projeto. Esquema criado no Biorender.com.

## 1.8. Análise instrumental

Os métodos analíticos desempenham um papel fundamental na interpretação da informação presente no analito, nomeadamente as suas características físicas e químicas. Esses métodos podem ser classificados como métodos instrumentais e métodos clássicos. Os métodos instrumentais, como a cromatografia, utilizam equipamentos mais sofisticados e de elevado custo, oferecendo maior precisão e eficiência em certas análises. Embora tenham superado algumas das limitações dos métodos clássicos, estes últimos continuam a ser muito utilizados, frequentemente de forma complementar, sendo alguns exemplos os métodos colorimétricos e volumétricos [69].

A seleção do método instrumental mais adequado é, portanto, uma etapa crítica em qualquer análise laboratorial. Essa escolha deve considerar não só as propriedades físicas e químicas da amostra, mas também os fatores práticos como a rapidez, facilidade de uso, custo, e o nível de conhecimento necessário por parte do operador. Além disso, a disponibilidade de equipamentos no laboratório pode ser decisiva para a seleção do método instrumental apropriado [69].

Dado o impacto significativo dos OPs, a respetiva monitorização tornou-se indispensável para avaliar tanto os riscos ambientais quanto os danos na saúde pública. A toxicidade dos OPs está associada a efeitos neurotóxicos nos humanos mesmo quando presentes em concentrações vestigiais, na ordem dos ppb. Desta forma, são necessários métodos analíticos sensíveis e específicos para detetar e quantificar

estes compostos em matrizes complexas. Entre as técnicas mais frequentemente utilizadas, destacam-se a cromatografia em fase gasosa (GC) e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), ambas acopladas à espectrometria de massa (MS) por apresentarem elevada precisão e por permitirem a identificação vestigial do composto alvo como são o caso dos OPs [14, 70].

Para além destas técnicas, têm vindo a ser desenvolvidos métodos complementares às técnicas cromatográficas tradicionais. Entre eles, os biossensores que permitem uma rápida monitorização e portabilidade, permitindo efetuar medições em tempo real podendo ser aplicados em campo. A combinação dessas abordagens permite a avaliação dos riscos associados aos OPs, garantindo maior proteção ao ambiente e à saúde humana [71].

### 1.8.1. Cromatografia em fase gasosa (GC)

A cromatografia é uma técnica analítica que permite separar os diferentes analitos presentes em amostras complexas [72]. O sistema cromatográfico é tipicamente constituído por um reservatório de gás, um injetor de amostra, uma coluna cromatográfica, inserida num forno, e um detetor, e está ligado a um computador com um *software* de análise adequado (Figura 1.13) [58, 69].

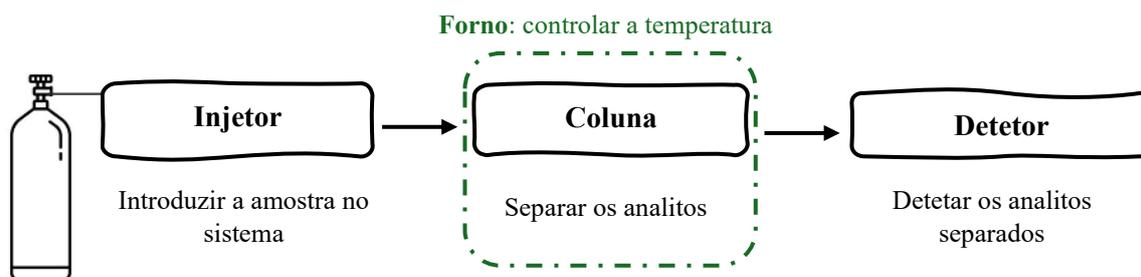


Figura 1.13- Esquema simplificado de um cromatógrafo em fase gasosa (GC); adaptado de [72].

A análise por GC tem início no injetor, que permite introduzir a amostra em estudo, no estado líquido ou gasoso, no sistema, tendo esta que ser volátil e termicamente estável. No injetor, a amostra é volatilizada e transportada pelo gás de arraste (fase móvel) pela coluna cromatográfica, onde atravessa a fase estacionária. A fase móvel é tipicamente um gás inerte (hélio, azoto ou hidrogénio), e a fase estacionária encontra-se fixa nas paredes de longas colunas capilares tubulares [58, 69, 72]. O injetor de vaporização pode operar em diferentes modos de injeção, no modo *split* (S), no qual grande parte da amostra é descartada pela *split vent* enquanto a restante porção segue para a coluna; no modo *splitless* (SL) o *split vent* permanece fechado na primeira fase da injeção, forçando a entrada total da amostra no sistema cromatográfico, sendo este o modo ideal para análise de amostras vestigiais (Figura 1.14) [58, 72, 73].

Um alternativa ao injetor de vaporização convencional é o injetor PTV (injetor de vaporização com temperatura programada), representado na Figura 1.15, muito usado na análise de amostras complexas e sensíveis à temperatura. Este injetor permite controlar a temperatura de injeção, aumentando-a rapidamente para vaporizar a amostra sem decompor os analitos. Neste processo, a amostra é inicialmente injetada a uma temperatura baixa e posteriormente, com o aumento balístico da temperatura e do gás de arraste, o solvente volátil evapora lentamente pela válvula (*solvent vent*), enquanto o analito permanece adsorvido no *liner*. O analito segue para coluna apenas após a evaporação e eliminação de

grande parte do solvente. Desta forma, é possível injetar grandes volumes (LVI) de amostra sem prejudicar o aparelho, o que permite diminuir os limites de detecção e aumentar a sensibilidade da análise, sem sobrecarregar a coluna [73].

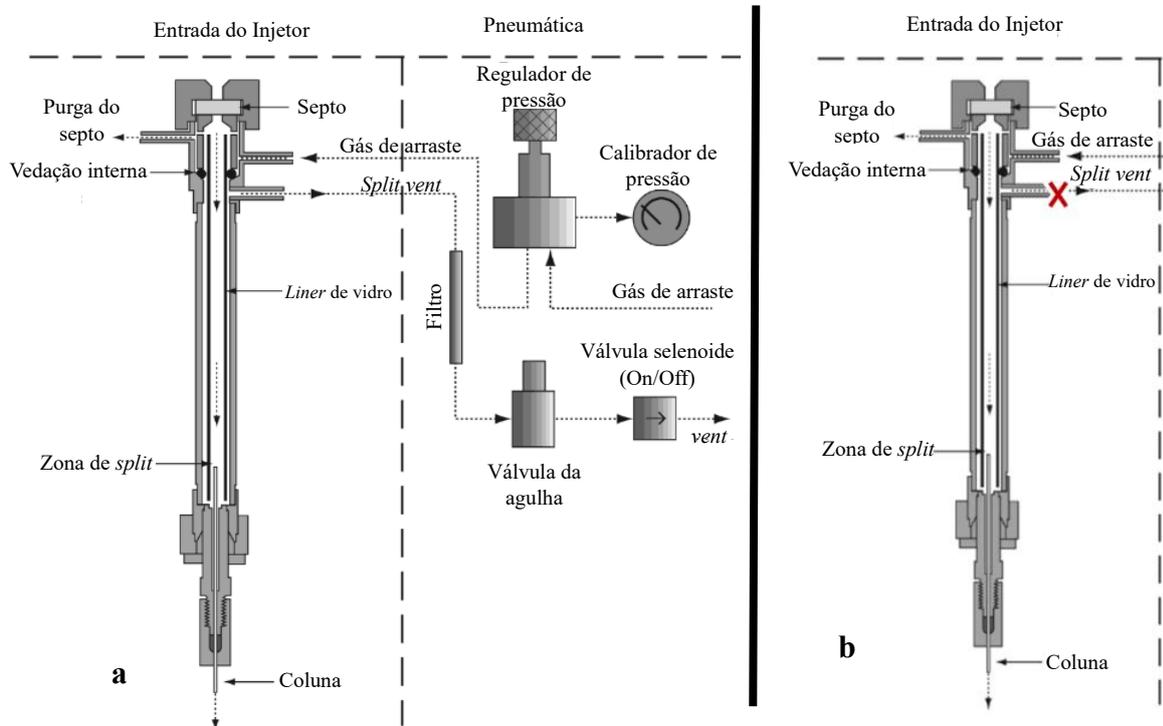


Figura 1.14- Esquema da injeção em modo *split* (a) e em modo *splitless* (b); adaptado de [74].

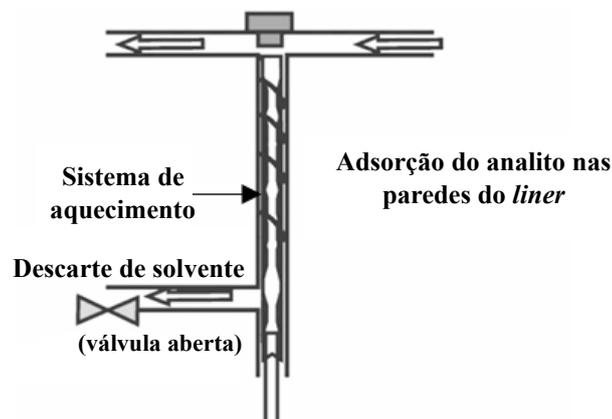


Figura 1.15- Esquema do injetor PTV; adaptado de [73].

Após a injeção, a amostra é transportada até à coluna pelo gás de arraste, onde esta é separada com base na interação diferencial dos seus componentes entre a fase estacionária e a fase móvel. A coluna, considerada o "coração" do GC, é uma coluna capilar com as paredes internas recobertas com um filme fino de fase estacionária, que pode ser polar ou apolar, conforme a natureza dos analitos em estudo [67, 69, 72]. O grau de afinidade dos analitos com a fase estacionária, está diretamente relacionada com as

características químicas e a polaridade, o que permite separá-los fisicamente, fazendo com que atinjam o detetor em intervalos de tempo distintos [69, 72].

A coluna encontra-se dentro de um forno, cujo controlo de temperatura é crucial para uma boa separação dos analitos. Para além da interação com a fase estacionária, o tempo que o analito demora a chegar ao detetor é também influenciado pela temperatura do forno. O forno pode operar de forma isotérmica (temperatura constante) ou com uma rampa de temperaturas, permitindo separar os analitos com base na sua volatilidade [73].

A saída da coluna cromatográfica está conectada ao detetor, que examina continuamente os analitos eluídos e gera sinal quando deteta a passagem dos analitos, gerando um cromatograma. Num cromatograma podemos observar diversos picos, e, através do tempo de retenção ( $t_R$ ) conseguimos identificar qualitativamente os analitos presentes, e, através da área dos mesmos obtemos a informação quantitativa. Para obter uma informação mais detalhada da estrutura molecular dos analitos alvo, recorre-se à espectrometria de massa (MS) que pode ser acoplada ao sistema GC, aumentando a seletividade e a sensibilidade [58, 69, 75]. Para informações mais detalhadas sobre os cálculos e conceitos cromatográficos, recomenda-se a consulta do Anexo I, onde estes tópicos são discutidos de forma detalhada.

### 1.8.2. Espetrometria de massa (MS)

A MS (Figura 1.16) permite obter informações adicionais, como o padrão de fragmentação e a estrutura molecular sobre os analitos eluídos da coluna cromatográfica. Este processo baseia-se na ionização dos compostos, seguida da respetiva fragmentação, o que permite obter um perfil único para cada analito, o espectro de massa. Esta técnica é tipicamente constituída por uma fonte de ionização, um analisador e um detetor iónico, estando todo este sistema em condições de alto vácuo para assegurar uma análise precisa e sensível [58, 69, 76].

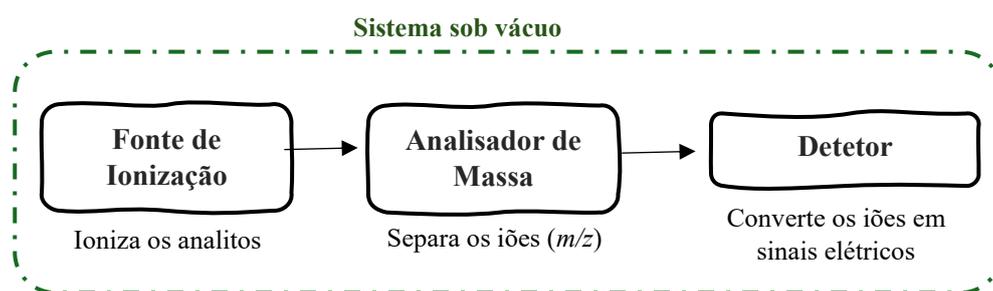


Figura 1.16- Esquema do simplificado espectrómetro de massa; adaptado de [76].

Após separação na coluna cromatográfica, os analitos são ionizados, transformando-se em iões monopositivos. Tipicamente é utilizada a ionização eletrónica (EI), em que as moléculas da amostra são bombardeadas com eletrões a 70 eV. Cada composto possui um padrão de fragmentação específico, permitindo a identificação dos compostos com base nos seus espectros característicos [58, 69, 76].

Os fragmentos ionizados são repelidos por um elétrico positivo e direcionados para o analisador de massa, onde são separados com base na sua razão massa carga ( $m/z$ ). O analisador mais utilizado é o quadrupolo, composto por quatro cilindros metálicos paralelos (dois cilindros opostos apresentam potencial positivo aplicado enquanto os outros dois potencial negativo), que opera em baixa resolução. O quadrupolo separa os íons aplicando campos elétricos (radiofrequência (RF) e corrente contínua (Vdc)), facilitando a passagem de certos íons com uma  $m/z$  específica através do quadrupolo enquanto os restantes são desviados da sua trajetória (Figura 1.17)[58, 69, 76].

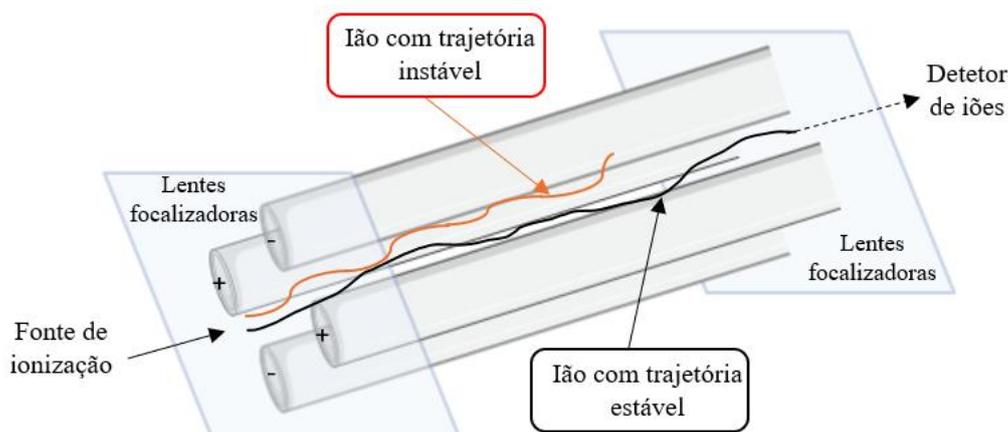


Figura 1.17- Representação esquemática do quadrupolo; adaptado de [73]. Esquema criado no BioRender.com.

Os analisadores como o quadrupolo podem operar em dois modos:

- Modo *full-scan* (de varrimento contínuo): neste modo, o GC-MS varre continuamente uma gama de fragmentos moleculares (valores de  $m/z$ ), criando um espectro de massa completo. Este modo é útil para confirmar a presença de certos compostos, uma vez que fornece uma visão geral das características de fragmentação de cada composto na amostra. No entanto, como analisa uma ampla gama de valores, apresenta menor sensibilidade e maior ruído do sinal, dificultando análises de moléculas em concentrações mais baixas. Por isso, é muito utilizado para identificar fragmentos importantes, podendo posteriormente, analisá-los de forma mais precisa no modo SIM [58, 69, 75].
- Modo SIM (monitorização de íons selecionados): monitoriza apenas um grupo específico fragmentos moleculares identificados pelos seus valores  $m/z$ . Este modo foca apenas fragmentos específicos, aumentando a sensibilidade do método e tornando-o ideal para análise vestigial, quando já sabemos quais os fragmentos característicos das moléculas alvo no espectro [58, 69, 75].

Concluída a separação dos íons pelo quadrupolo, estes são direcionados para o detetor, que converte esses íons em sinais elétricos mensuráveis. O detetor mais comum em MS é o multiplicador de elétrons (Figura 1.18), que, ao receber os íons provenientes do analisador, gera uma cascata de elétrons. Os íons atingem uma superfície do detetor provocando a libertação de elétrons secundários.

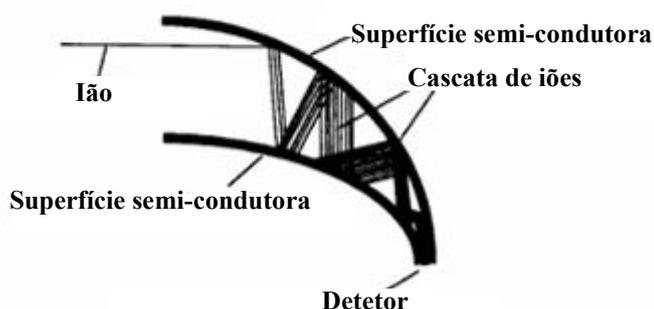


Figura 1.18- Esquema do detector multiplicador de elétrons; adaptado de [77].

Estes elétrons secundários são por sua vez acelerados promovendo novas colisões com a superfície do detector resultando na liberação de mais elétrons. Esse processo de amplificação gera uma cascata de elétrons, cuja quantidade aumenta exponencialmente. A cascata gerada é amplificada e convertida num sinal elétrico, cuja intensidade é proporcional à quantidade de íons detetados. Após a amplificação, obtemos um fluxo de elétrons, gerado a partir de um único íon, que é convertido num sinal elétrico mensurável. Esse sinal é registrado e processado, permitindo criar o espectro de massa característico de cada composto [77].

### 1.8.3. Hifenação GC-MS

A técnica hifenada GC-MS (Figura 1.19), combina a capacidade de separação da GC com a sensibilidade e seletividade da MS, sendo ideal para a análise de amostras complexas. A GC-MS permite separar os analitos e obter informações quantitativas a partir dos  $t_R$  dos cromatogramas e obter informações qualitativas e estruturais a partir dos espectros de massa [72]. Todo o processo analítico é controlado por *software* que programa todo o sistema de análise e processa os dados para gerar cromatogramas e espectros de massa, permitindo a identificação dos analitos com base na sua  $m/z$  e padrões de fragmentação [72]. Esta técnica hifenada é amplamente utilizada na análise de amostras voláteis e semi-voláteis em diversas áreas, desde a farmacêutica à ambiental [2].

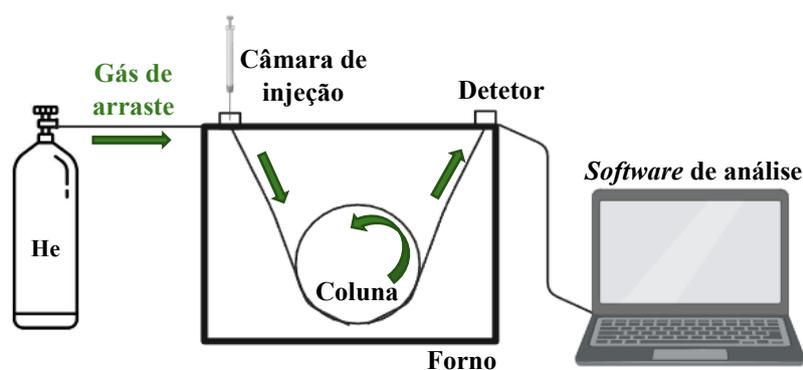


Figura 1.19- Esquema do GC-MS; adaptado de [76]. Esquema criado no BioRender.com.

## 2. Objetivos

O presente trabalho focou-se no desenvolvimento de uma metodologia alternativa que demonstrasse ser eficaz na monitorização vestigial de cinco OPs (etoprofos, diazião, metil-paratião, malatião e clorpirifos) em matrizes aquosas.

Com esse propósito recorreu-se a uma metodologia inovadora combinando a HF $\mu$ E com GC-MS e estabeleceram-se os seguintes objetivos:

- . Otimização das condições instrumentais;
- . Otimização da metodologia HF $\mu$ E- $\mu$ LD/GC-MS para identificação dos OPs em matrizes aquosas;
- . Validação da metodologia previamente otimizada, avaliando os parâmetros de linearidade, sensibilidade, seletividade e precisão;
- . Aplicação da metodologia otimizada e validada em diferentes matrizes reais de água para averiguar a influência da matriz no seu desempenho;
- . Comparação da metodologia proposta e dos resultados obtidos com outras tecnologias relatadas na literatura.

### 3. Parte Experimental

#### 3.1. Material, reagentes e amostras

O acetato de etilo (EtAc, C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>, 99,0 %), o *n*-hexano (*n*-C<sub>6</sub>, C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>, 99 %), o diclorometano (DCM, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 99,9 %) e a acetona (Ace, C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O, 99 %) foram obtidos da Carlo Erba (França). O metanol (MeOH, CH<sub>3</sub>OH, 99,9 %) foi obtido pela PanReac (Espanha). O *n*-heptano (*n*-C<sub>7</sub>, C<sub>7</sub>H<sub>16</sub>, 99 %) foi obtido da Sigma-Aldrich (Alemanha). O *n*-octano (*n*-C<sub>8</sub>, C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>, 99 %) foi obtido da Fluka AG (Suíça). O *n*-nonano (*n*-C<sub>9</sub>, C<sub>9</sub>H<sub>20</sub>, 99 %) foi obtido da ThermoFisher (Alemanha). O tolueno (Tol, C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>, 99 %) foi obtidos da Merck (Alemanha). O cloreto de sódio (NaCl, 99,5 %) foi obtido da Honeywell (Alemanha).

A solução padrão de mistura de OPs (600 mg/L em acetato de etilo) contendo diclorvos (C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>4</sub>P, 98,3 %), acefato (C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>NO<sub>3</sub>PS, 98 %), etoprofos (C<sub>8</sub>H<sub>19</sub>O<sub>2</sub>PS<sub>2</sub>, 98,2 %), dibromo (C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>Br<sub>2</sub>Cl, 98 %) dimetoato (C<sub>5</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>3</sub>PS<sub>2</sub>, 99,16 %), diazião (C<sub>12</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>PS, 99,3 %), metil-paratião (C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>NO<sub>5</sub>PS, 99,33 %), malatião (C<sub>10</sub>H<sub>19</sub>O<sub>6</sub>PS<sub>2</sub>, 97 %), clorpirifos (C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>Cl<sub>3</sub>NO<sub>3</sub>PS, 99,89 %) e fosmete (C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>4</sub>PS<sub>2</sub>, 96,86 %), foi adquirido pela Dr. Ehrenstorfer, LGC (EUA). Para a metodologia por HFμE, foram utilizadas membranas de fibra oca de PP (Accurel Q3/2), com diâmetro interno de 600 μm, espessura da parede de 200 μm e tamanho dos poros de 0,2 μm, obtidas pela 3M (Alemanha).

A matriz real de água de torneira utilizada neste projeto foi recolhida do próprio laboratório. A água de estuário foi recolhida no rio Tejo, mais propriamente no Porto Brandão e a água de ETAR foi gentilmente cedida pela estação de tratamento de águas residuais urbanas de Beirolas. Todas as amostras de água foram armazenadas a 4 °C.

#### 3.2. Equipamentos e instrumentação

Para o desenvolvimento da metodologia HFμE, além de material corrente de laboratório, utilizaram-se frascos de 25 mL com as respetivas tampas de polietileno (PE, (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)<sub>n</sub>) (diâmetro = 22 mm) obtidos pela VWR International (EUA), as microseringas analíticas de 10 e 100 μL (Hamilton, EUA) e micropipetas de capacidade de 100 - 1000 μL e 20 - 200μL (Labok, Espanha), *vials* transparentes de 2 mL (12 × 32 mm) com as respetivas tampas com septo de politetrafluoretileno/silicone (PTFE) (diâmetro = 11 mm) e *inserts* (300 μL, 6 × 31 mm) obtidos da Zhejiang Alwsci Technologies (China), barras de agitação de Teflon (Gerstel e CRYSTAL Europe, Alemanha) e um encapsulador manual obtido da Agilent Technologies (EUA).

Os ensaios de microextração foram realizados em duas placas de agitação magnética compostos por quinze posições (Variomag, Alemanha). Para efetuar as pesagens recorreu-se a uma balança analítica (Mettler Toledo AG135, Suíça). Foram também utilizados um vórtex (Velp, Itália), um banho de ultrassons equipado com um termóstato de modelo 3510 E-DTH (Branson, EUA) e uma estufa de modelo ED 115/E2 (Binder, Alemanha). Para a preservação e armazenamento de amostras e padrões utilizou-se dois congeladores verticais, com temperaturas de - 80 °C e de - 20 °C (Jocel JCV-220L, Portugal) e um frigorífico a 4 °C (Liebherr FKEX 2600, Áustria).

As análises por GC-MS foram efetuadas pelo equipamento Agilent Technologies (Alemanha), constituído por um cromatógrafo em fase gasosa (Agilent 6890 Series) equipado com amostrador automático (Agilent 7683), um injetor *split/splitless* (S/SL), um injetor de vaporização com temperatura programada (PTV) e um detetor seletivo de massa (Agilent 5973N). Para a separação dos compostos utilizou-se a coluna capilar InertCap 5MS (30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno × 0,25 μm de

espessura da fase estacionária: 5 % difenil; 95 % dimetilpolisiloxano) foi obtida da GL Sciences (Japão). A partir do software MSD ChemStation (G1701A, versão E.02.02.1431, Agilent Technologies, EUA) foram adquiridos os dados analíticos e o respetivo controlo instrumental. Para a comparação espectral, utilizou-se a base de dados da biblioteca de espetros da Wiley (G1035B, Rev. D.02.00, Agilent Technologies, EUA).

### 3.3. Procedimento

#### 3.3.1. Preparação da solução padrão

A solução padrão adquirida para este projeto é composta por dez pesticidas (diclorvos, acefato, etoprofos, dimetoato, dibromo, diazião, metil-paratião, malatião, clorpirifos e fosmete) e apresenta uma concentração de 600 mg/L. Esta solução foi armazenada a - 80 °C. Destes dez pesticidas serão apenas estudados cinco o etoprofos, diazião, metil-paratião, malatião e clorpirifos. Mensalmente, a partir dessa solução padrão, preparou-se uma solução diluída em acetato de etilo (EtAc), com uma concentração final de 10 mg/L. Esta, por sua vez, era submetida a uma nova diluição semanal, obtendo-se uma solução de concentração final de 5 mg/L em metanol (MeOH). Ambas as soluções diluídas foram mantidas a - 20 °C e renovadas quando necessário. Todas as soluções utilizadas no decorrer do trabalho foram preparadas em MeOH, tendo como base a solução de 5 mg/L.

Face aos problemas enfrentados ao longo do projeto, que condicionaram a etapa de injeção das amostras no GC-MS, foi realizado um estudo de estabilidade das amostras extraídas. Este estudo consistia na injeção da mesma amostra extraída no sistema GC-MS, por vários dias consecutivos, comparando os cromatogramas obtidos e as respetivas abundâncias de cada um dos analitos. Os resultados demonstraram que as amostras armazenadas se mantiveram estáveis até uma semana após a extração. Este dado foi essencial para o planeamento das análises.

#### 3.3.2. Calibração instrumental

Os limites de deteção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram determinados a partir da injeção de soluções padrão com concentrações sucessivamente menores no sistema cromatográfico, seguindo o critério de razão sinal/ruído (S/N) de 3/1 e de 10/1 respetivamente. Para estudar a linearidade e construir as respetivas retas de calibração, foram preparados dez níveis de concentração (3; 2,5; 2; 1,5; 1; 0,5; 0,25; 0,15; 0,1 e 0,05 mg/L), para o modo de injeção SL, e onze níveis de concentração (50; 35; 25; 20; 15; 10; 7; 5; 2,5; 1; 0,75 µg/L) para o injetor PTV (LVI). Todas as soluções utilizadas foram preparadas em triplicado por diluição das soluções padrão de concentração 10 mg/L e 1 mg/L. A precisão instrumental foi igualmente avaliada através de injeções consecutivas de soluções padrão de concentração 0,5 mg/L, no modo SL, e 7 µg/L, no injetor PTV (LVI), analisadas em quintuplicado.

#### 3.3.3. Preparação dos dispositivos HFµE

Para utilizar a metodologia HFµE/GC-MS é necessário primeiramente preparar a fibra microextratora em laboratório. Para tal, cortaram-se segmentos de 10 mm da uma membrana de PP, adquirida comercialmente. De seguida, efetuou-se uma etapa de pré-condicionamento, na qual as fibras passaram por uma fase de lavagem, sendo imersas em água ultrapura e acetona, e, de seguida secas numa estufa a  $50 \pm 1$  °C [67, 78].

### 3.3.3.1 Ensaios de Otimização

Para os ensaios de microextração foram colocados, dentro de um frasco de amostragem, um ímã e 25 mL de água ultrapura fortificada com 100 µL da solução padrão contendo os cinco OPs com concentração 2,5 mg/L (Figura 3.1). De seguida, foi inserido, com o auxílio de uma pinça, o dispositivo de microextração previamente preenchido com um solvente adequado. O processo de microextração foi efetuado com recurso a placa de agitação durante um período de tempo e velocidade. Finalizada a microextração, o dispositivo foi retirado do tubo de amostragem para um *vial* com *insert*, contendo 100 µL do solvente previamente usado, e sujeito à retroextração utilizando ultrassons, por um determinado período de tempo. Posto isto, o *vial* segue para análise por GC-MS.

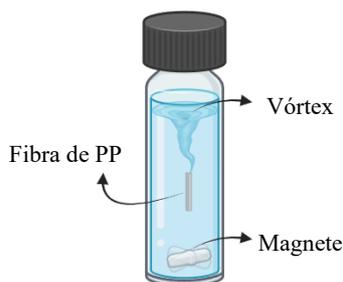


Figura 3.1- Esquema ilustrativo da HFµE em flutuação durante a extração. Abreviatura: PP - polipropileno. Esquema criado no BioRender.com.

Em suma, este procedimento segue o ciclo analítico da HFµE, que se divide em duas etapas: a microextração dos analitos da matriz e a retroextração para um solvente adequado, permitindo assim a posterior injeção e análise por GC-MS. Para garantir a eficiência deste processo, foi adotada uma estratégia de otimização univariada (OVAT), na qual todas as variáveis são mantidas constantes à exceção de uma. O objetivo é estudar o impacto de cada variável, em diferentes níveis, na resposta do sistema [65, 67]. Os detalhes dos parâmetros estudados encontram-se representados no gráfico da Figura 3.2.

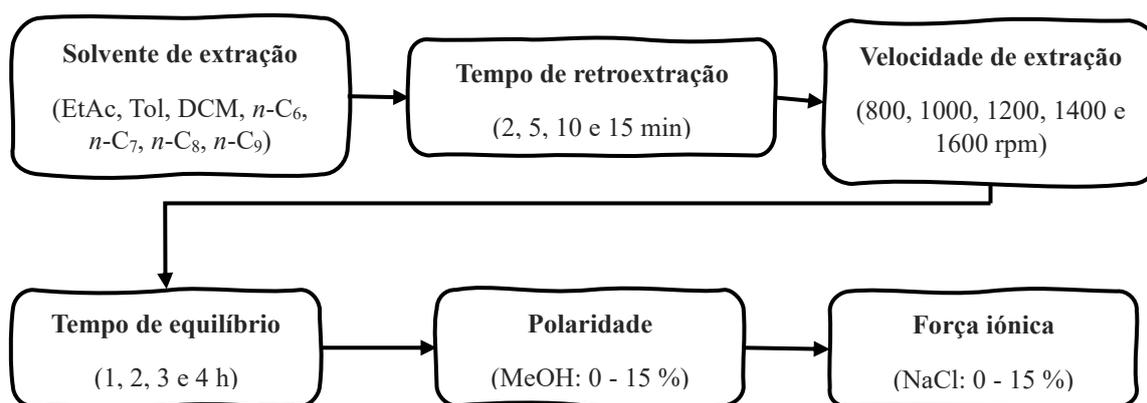


Figura 3.2- Fluxograma da otimização univariada das diferentes fases da microextração por HFµE.

A otimização desta técnica microextratora iniciou-se com seleção do solvente de extração, utilizando as seguintes condições padrão: microextração por 1 hora a 1000 rpm e retroextração por 10 minutos sob tratamento ultrassónico. Em seguida, foi otimizado o tempo de sonificação, a única variável da etapa de

retroextração. Posteriormente, foram ajustados parâmetros referentes novamente à etapa de microextração, como a velocidade de agitação e tempo de equilíbrio. Por fim, avaliou-se o efeito matriz, nomeadamente a polaridade, através da adição de MeOH, e a força iónica, mediante a adição de NaCl [67, 79].

Todos os ensaios de otimização foram realizados em triplicado e a respetiva eficiência de extração foi avaliada através do cálculo das recuperações dos analitos, utilizando a seguinte equação (Equação 3.1):

$$R(\%) = \frac{A_i}{A_p} \times 100$$

Equação 3.1

Onde,  $A_i$  corresponde à área do pico do analito obtido nos ensaios de extração e  $A_p$  à área do pico do analito na solução padrão utilizada para fortificação [79].

### 3.3.3.2 Ensaios de Validação

Concluída a otimização das condições experimentais, procedeu-se à validação da metodologia proposta, seguindo o procedimento previamente descrito, em condições otimizadas (microextração: solvente *n*-C<sub>8</sub>:Tol; 1:1, v/v, 2 h (1600 rpm), 10 % MeOH, 10 % NaCl; retroextração: 2 min sob tratamento ultrassónico, utilizando 100 µL de solvente *n*-C<sub>8</sub>:Tol; 1:1, v/v) no qual foram avaliados parâmetros essenciais como a linearidade, seletividade, sensibilidade e precisão.

Foram preparadas amostras de calibração com concentrações compreendidas entre 0,0175 – 1,25 mg/L que foram posteriormente analisadas com o método propostos permitindo construir as retas de calibração para cada composto. A linearidade foi avaliada através do  $r^2$  obtido para cada composto.

A sensibilidade da metodologia foi avaliada através limites analíticos, LOD e LOQ, determinados experimentalmente através de injeção sucessiva de soluções com OPs tendo em conta a razão S/N de 3/1 e 10/1 respetivamente. A seletividade foi avaliada aplicando o método de extração otimizado a amostras em branco e verificando a ausência de interferentes nos mesmos tempos de retenção de cada analito em estudo.

Para determinar precisão intra-dia (repetibilidade) e inter-dia (precisão intermédia) prepararam-se três níveis de concentração, baixo (0,125 mg/L), médio (0,25 mg/L) e alto (1,25 mg/L), correspondentes a concentrações finais de 0,5; 1 e 5 µg/L, respetivamente. A repetibilidade foi determinada por meio de cinco replicados ( $n = 5$ ) de cada nível de concentração, no mesmo dia, enquanto a precisão intermédia foi estudada realizando três replicados de cada nível, durante três dias consecutivos ( $n = 3$ , 3 dias consecutivos).

O critério de aceitação para avaliar a precisão foi definido pelo desvio padrão relativos (RSD, do inglês *Relative standard deviation*). O cálculo do RSD foi realizado de acordo com a Equação 3.2:

$$RSD(\%) = \frac{\sigma}{\bar{x}} \times 100$$

Equação 3.2

Onde  $\sigma$  representa o desvio padrão das recuperações obtidas e  $\bar{x}$  a média dos valores assinalados.

### 3.3.3.3 Aplicação em matrizes reais

Com o objetivo de avaliar a aplicabilidade da metodologia otimizada e validada, foram realizados ensaios em matrizes reais, nomeadamente em amostras de água de ETAR, de estuário e da torneira, seguindo as condições otimizadas e validadas (microextração: solvente *n*-C<sub>8</sub>:Tol; 1:1, v/v, 2 h (1600 rpm), 10 % MeOH, 10 % NaCl; retroextração: 2 min sob tratamento ultrassónico, utilizando 100 µL de solvente *n*-C<sub>8</sub>:Tol; 1:1, v/v). Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

Para cada tipo de amostra, foram transferidos 25 mL para frascos de amostragem, aos quais se adicionaram 100 µL de solução padrão previamente preparada, com concentrações variando entre 0,25 - 5 mg/L, correspondendo a 1 - 20 µg/L. Excepcionalmente, para as amostras de água da torneira, foi necessário deixar a água expostas ao ar por 24 horas para permitir a evaporação do cloro, um composto volátil utilizado no processo de desinfecção, que poderia interferir com o processo analítico e comprometer os resultados.

## 4. Discussão de Resultados

### 4.1. Otimização das condições instrumentais

Para garantir as condições instrumentais ideais para este projeto, começou-se por injetar uma solução dos OPs no GC-MS, operando no modo *full-scan*. Desta forma foi possível verificar parâmetros como os  $t_R$  e os espectros de massa (Anexo II) característicos de cada composto, que são essenciais para a identificação dos mesmos. Os dados obtidos permitiram identificar individualmente os compostos-alvo e ajustar os parâmetros necessários para obter um espectro com picos bem resolvidos e com um menor tempo de corrida possível (15 min com um *solvent delay* de 4 min).

Após otimização do método cromatográfico analisaram-se dados espectrais e, em comparação com as bibliotecas espectrais disponíveis, como a *Wiley*, selecionaram-se os iões moleculares e os principais fragmentos de cada composto. Com os iões selecionados, realizou-se uma nova injeção da solução padrão no modo SIM, permitindo alcançar uma melhor seletividade e sensibilidade. Na Tabela 4.1, observam-se os iões selecionados para cada composto, estando representados a negritos os iões de quantificação.

Tabela 4.1- Iões selecionados no modo SIM para cada analito. Iões de quantificação assinalados a negrito.

OPs	Iões SIM (m/z)
Etoprofos	97, <b>158</b> , 200
Diazião	<b>179</b> , 276, 304
Metil-Paratião	125, 246, <b>263</b>
Malatião	93, <b>125</b> , 173
Clorpirifos	<b>197</b> , 258, 314

Neste projeto foram utilizados dois modos de injeção, cujos parâmetros analíticos otimizados estão descritos na Tabela 4.2. E na Figura 4.1 podemos observar os cromatogramas obtidos com os cinco OPs nos dois modos de injeção.

Na fase de otimização utilizou-se um injetor S/SL com o modo de injeção SL, no qual foi definido um volume de injeção de 2  $\mu$ L. Nas análises posteriores, nomeadamente a validação e testes em matrizes reais, recorreu-se a um injetor PTV, no modo LVI, utilizando o *solvent vent*, com um volume de injeção de 20  $\mu$ L. Esta alteração permitirá alcançar elevada sensibilidade, conforme requerido pelos valores estipulados pela Diretiva (UE) 2020/2184, referente à água de consumo humano como pelo Decreto-Lei n.º 236/98, relacionado com as águas superficiais [53, 54]. Para ambos os modos de injeção, aplicou-se a ionização eletrónica a 70 eV, operando numa gama de massas ( $m/z$ ) entre 45 e 550 Da com um potencial multiplicador de 1200 V.

É importante notar que se observou um deslocamento nos tempos de retenção de todos os compostos quando analisados no PTV. Uma injeção do padrão em modo *full-scan* permitiu confirmar que, apesar desse desvio, os espectros de massa obtidos correspondiam aos analitos em estudo. Para garantir a deteção adequada, foram realizadas injeções em modo *full-scan*, com uma maior regularidade ao longo do estudo, assegurando que as janelas do modo SIM incluíam os analitos de interesse.

Tabela 4.2- Parâmetros analíticos do modo de injeção *splitless* e LVI e os tempos de retenção para cada OP.

Parâmetros Analíticos	<i>Splitless</i>	PTV (LVI)
<b>Injeção</b>	<b>Pressão:</b> 10,4 psi <b>Seringa:</b> 10 µL (injeção de 2µL)	<b>Tempo de vent:</b> 150 mL/min (0 psi nos primeiros 30 seg) <b>Pressão:</b> 14,3 psi <b>Seringa:</b> 100 µL (injeção de 20µL)
<b>Programa de injeção</b>	270 °C	40 °C (0,35 min de isotermita) a 320 °C (600 °C/min, 3 min de isotermita) até 200 °C (50 °C/min)
<b>Forno</b>	60 °C (1 min de isotérmica) até 300 °C (20 °C/min, 1 min de isotérmica)	
<b>Tempo de retenção (min)</b>	<b>Etoprofos:</b> 9,68 <b>Diazião:</b> 10,65 <b>Metil-paratião:</b> 11,30 <b>Malatião:</b> 11,61 <b>Clorpirifos:</b> 11,77	<b>Etoprofos:</b> 10,16 <b>Diazião:</b> 11,07 <b>Metil-paratião:</b> 11,77 <b>Malatião:</b> 12,07 <b>Clorpirifos:</b> 14,48

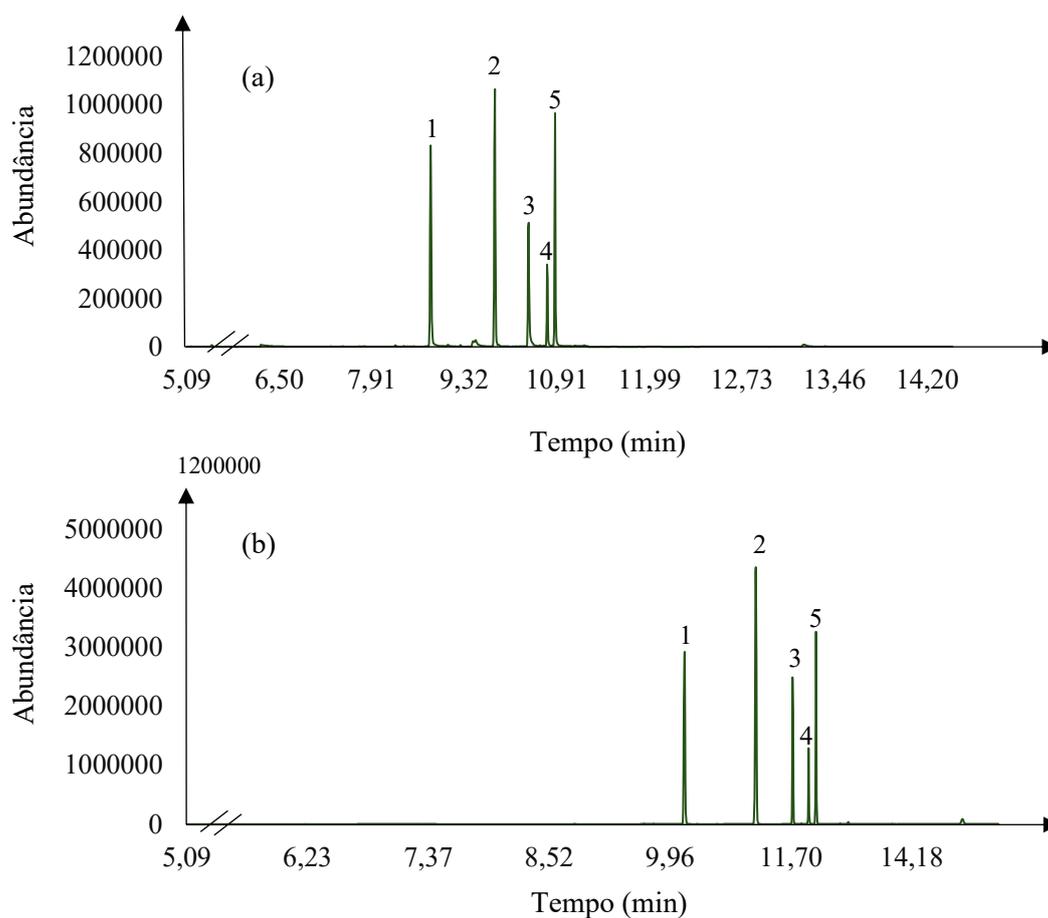


Figura 4.1- Cromatogramas obtidos por GC-MS da solução padrão injetada em modo *splitless* a concentração 10 mg/L (a) e em modo *solvent vent* (PTV) a 1 mg/L (b). 1. Etoprofos, 2. Diazião, 3. Metil-paratião, 4. Malatião, 5. Clorpirifos.

## 4.2. Calibração Instrumental

A partir de injeções sucessivas de soluções preparadas por diluição de soluções com 5 mg/L e 1 mg/L até obter uma razão S/N de 3/1 e 10/1 determinaram-se respectivamente os LOD e LOQ para cada composto usando os dois modos de injeção. No SL foram obtidos  $0,01 \leq \text{LOD} \leq 0,04$  mg/L e  $0,04 \leq \text{LOQ} \leq 0,1$  mg/L. Enquanto para o PTV obtiveram-se  $0,075 \leq \text{LOD} \leq 0,4$  µg/L e  $0,7 \leq \text{LOD} \leq 1$  µg/L.

Subsequentemente, construíram-se retas de calibração a partir da injeção de dez soluções padrão contendo concentrações compreendidas entre 3 e 0,05 mg/L, para o modo SL, e de onze soluções padrão com concentrações compreendidas entre 50 e 0,75 µg/L para o PTV. Tendo em conta os resultados obtidos foi possível verificar uma boa linearidade para os cinco OPs em estudo, com um coeficiente de determinação ( $r^2$ ) superior a 0,9975 no SL e superior a 0,9963 no PTV.

A precisão instrumental foi igualmente avaliada através de cinco injeções consecutivas da mistura padrão com concentração de 0,5 mg/L, no SL, obtendo um RSD  $\leq 6,5$  %, e com concentração de 7 µg/L, no PTV, obtendo um RSD  $\leq 8,7$  %.

## 4.3. Otimização do método HFµE

Com os parâmetros instrumentais estabelecidos, prosseguiu-se para a otimização das diferentes etapas do método da HFµE, nomeadamente a eficiência do solvente de extração, tempo de retro-extração, velocidade de agitação, tempo de equilíbrio, a polaridade e a força iónica. Os parâmetros foram estudados seguindo a abordagem OVAT, partindo das condições experimentais padronizadas, descritas na literatura: na fase de microextração: 1 h (1000 rpm), MeOH (0 %) e NaCl (0 %); e na fase de retroextração: 10 minutos sob tratamento ultrassónico [67, 80].

A eficiência de extração de cada etapa foi avaliada através da comparação entre as recuperações obtidas. A recuperação indica a quantidade de compostos extraído pela técnica de microextração, permitindo avaliar a influência destas etapas na eficiência da migração dos analitos para o solvente de extração e a sua dessorção no solvente orgânico de retroextração, que permite a posterior injeção e análise dos analitos por GC-MS.

### 4.3.1. Seleção do solvente

A seleção do solvente de extração tem grande impacto no processo de microextração, influenciando diretamente a afinidade dos analitos presentes na matriz com a fase extratora, isto é, a seletividade do solvente com os analitos em estudo. O solvente selecionado deve ser imiscível com a água, garantindo a formação de uma segunda fase, facilitando a difusão dos analitos presentes na matriz para o dispositivo de microextração. Além disso, deve ser pouco volátil para minimizar perdas por evaporação, tanto entre a etapa de preparação da fibra e o início do processo de microextração, durante as quais o solvente permanece exposto à temperatura ambiente, como durante a injeção no GC-MS [67, 81].

A seleção dos solventes a utilizar teve por base os trabalhos referidos na literatura, onde estudaram compostos similares assim como matrizes idênticas, e a disponibilidade dos mesmos em laboratório. Com os parâmetros anteriormente descritos fixos, foram testados sete solventes orgânicos (Tol, DCM, EtAc, *n*-C<sub>6</sub>, *n*-C<sub>7</sub>, *n*-C<sub>8</sub> e *n*-C<sub>9</sub>) e avaliada a respetiva seletividade para com os cinco OPs em estudo. Os ensaios foram realizados em triplicado. No gráfico da Figura 4.2, é possível visualizar as recuperações médias obtidas utilizando os diferentes solventes na extração dos analitos-alvo.

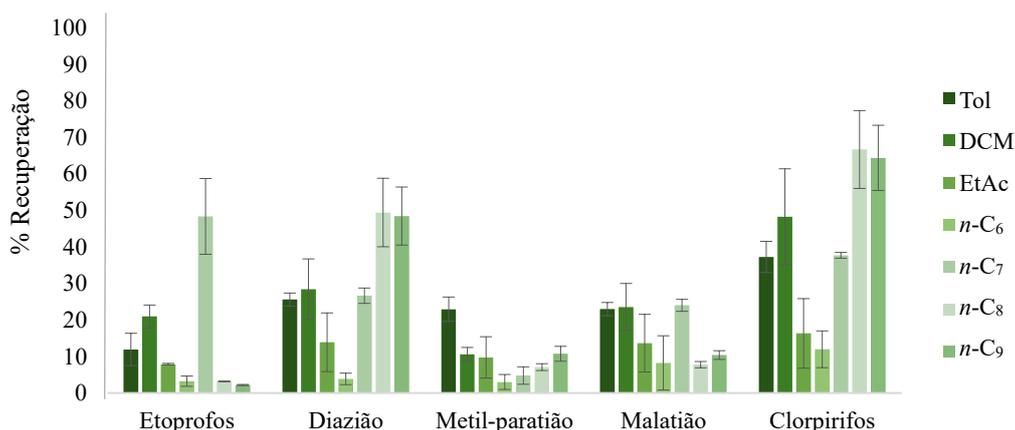


Figura 4.2- Estudo da seletividade dos diferentes solventes testados na recuperação dos OPs em estudo, em meio aquoso, obtido por HF $\mu$ E- $\mu$ LD/GC-MS(SIM). Ensaios realizados em triplicado. Condições experimentais: microextração, 1 h (1000 rpm); retroextração, 10 min sob tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio padrão de três replicados.

A análise inicial dos resultados obtidos permite destacar que os solventes *n*-C<sub>7</sub>, *n*-C<sub>8</sub> e *n*-C<sub>9</sub> aparentam proporcionar uma melhor resposta analítica. Avaliando ao pormenor, foi possível verificar que os solventes *n*-C<sub>9</sub> e *n*-C<sub>8</sub> demonstraram um desempenho muito superior para os analitos clorpirifos e diazião obtendo as respetivas recuperações de 50 % e 64 %, utilizando o *n*-C<sub>9</sub>, e de 49 % e 66 %, utilizando *n*-C<sub>8</sub>. O Tol, demonstrou ser o solvente mais eficiente na extração do metil-paratião, apresentando uma recuperação média superior a 20 %. No caso do malatião, três solventes apresentaram recuperações semelhantes, sendo estes o *n*-C<sub>7</sub>, o DCM e o Tol, apresentando todos uma recuperação superior a 20 %. Por sua vez, o etoprofos apresentou uma recuperação mais elevada, superior a 45 %, quando utilizado *n*-C<sub>7</sub>.

A partir destes ensaios preliminares, verificou-se que os solventes *n*-C<sub>7</sub>, *n*-C<sub>8</sub> e *n*-C<sub>9</sub> apresentaram resultados que os destacaram dos restantes. No entanto, durante a realização destes ensaios verificaram-se problemas instrumentais, nomeadamente a placa de agitação apresentava velocidades de extração variáveis para as diferentes posições (visível a olho nu ao observar a rotação da HF $\mu$ E), influenciando assim a eficiência do processo extrativo de alguns dos ensaios.

Tendo em conta essa situação, realizaram-se novos ensaios de extração utilizando apenas estes três solventes com o intuito de selecionar até dois solventes para prosseguir para as etapas de otimização seguintes. Os resultados obtidos com estes ensaios podem ser observados na Figura 4.3.

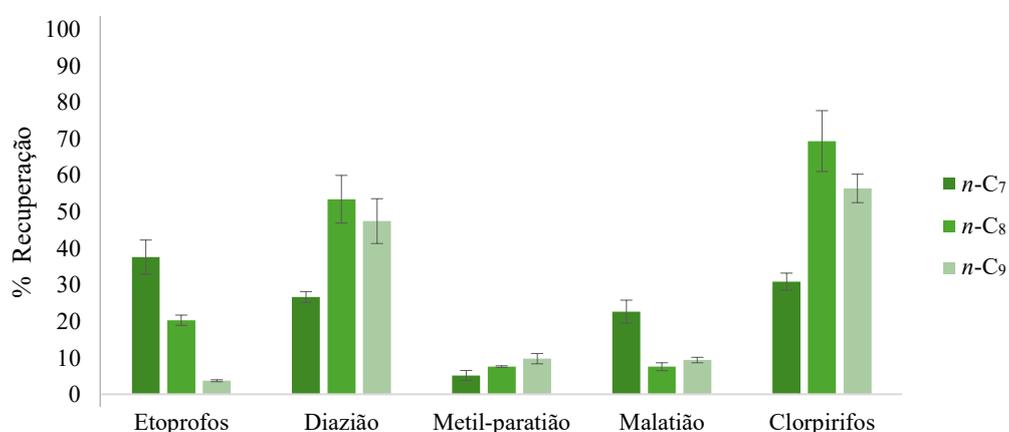


Figura 4.3- Estudo da seletividade de três solventes testados (*n*-C<sub>7</sub>, *n*-C<sub>8</sub> e *n*-C<sub>9</sub>) na recuperação dos OPs em estudo, em meio aquoso, obtido por HF $\mu$ E- $\mu$ LD/GC-MS(SIM). As análises foram efetuadas em triplicado. As barras de erro representam o desvio padrão de três replicados.

Por análise do gráfico de barras, foi possível verificar que as melhores recuperações foram atingidas utilizando os solventes *n*-C<sub>9</sub> e *n*-C<sub>8</sub>, obtendo, respetivamente, recuperações superiores a 55 % e 65 % para o clorpirifos, superiores a 50 % e 50 % para o diazião e para o metil-paratião, superiores a 9 %, e 7 %. No caso do etoprofos, a melhor recuperação foi obtida utilizando *n*-C<sub>7</sub> e *n*-C<sub>8</sub>, obtendo recuperações superiores a 20 % com ambos os solventes. No caso do malatião, com os solventes *n*-C<sub>7</sub> e *n*-C<sub>9</sub> obtiveram-se recuperações de 14 % e 10 % respetivamente. De uma forma geral, o *n*-C<sub>7</sub> apresentou valores de recuperação significativamente inferiores aos dos outros dois solventes.

Posteriormente, ao avaliar a precisão atendendo aos valores de RSD (%), verificou-se que os solventes *n*-C<sub>8</sub> e o *n*-C<sub>9</sub> apresentavam valores mais robustos, com RSD inferiores a 20 %. Os valores observados variaram entre 3,2 % e 14,5 % para o *n*-C<sub>8</sub> e entre 3,6 % e 14,6 % para o *n*-C<sub>9</sub>. Pelo contrário, o solvente *n*-C<sub>7</sub> apresentava valores de RSD mais elevados, variando entre 7,7 % e 26,4 %.

Assim sendo, os solventes *n*-C<sub>8</sub> e *n*-C<sub>9</sub> demonstraram ser os mais eficientes na extração dos OPs, sendo os seleccionados para proceder com a otimização.

#### 4.3.2. Otimização da etapa de retroextração

Seleccionados os melhores solventes, *n*-C<sub>8</sub> e *n*-C<sub>9</sub>, prosseguiu-se para a otimização da etapa de retroextração. A otimização do tempo de retroextração permite aferir o período necessário de tratamento ultrassónico para ocorrer a dissolução máxima dos analitos presentes no dispositivo HF $\mu$ E para o solvente de retroextração presente no *insert*. Esta etapa é crucial para garantir que os analitos são eficientemente recuperados e que possam ser posteriormente injetados e analisados no GC-MS. Com base na literatura, foram estudados tempos de sonificação 2, 5, 10 e 15 minutos, com ambos os solventes, mantendo os restantes parâmetros fixos. Os ensaios foram realizados em triplicado. Os resultados obtidos podem ser observados no gráfico da Figura 4.4.

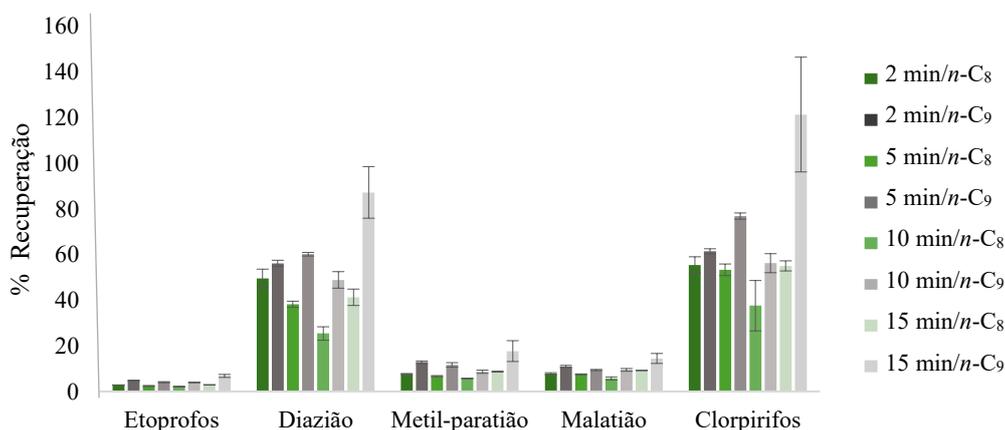


Figura 4.4- Efeito do tempo de retroextração na recuperação dos OPs em estudo, em meio aquoso, obtido por HF $\mu$ E- $\mu$ LD/GC-MS(SIM) utilizando os solventes de extração *n*-C<sub>9</sub> e *n*-C<sub>8</sub>. Ensaios realizados em triplicado. Condições experimentais: microextração, 1 h (1000 rpm). As barras de erro representam o desvio padrão de três replicados.

Por observação dos resultados obtidos foi possível verificar que um tempo de retroextração de 15 minutos proporcionou a melhor recuperação para o clorpirifos, obtendo uma recuperação de 111 %, e para o diazião, com uma recuperação de 87 %, utilizando o solvente *n*-C<sub>9</sub>. Contudo, durante o processo

de extração desta solução, observou-se uma instabilidade da placa de agitação. Dado que essa condição resultou num valor de RSD superior a 20 %, optou-se por descartar esta opção.

Por sua vez, verificou-se que os tempos de retroextração de 5 minutos apresentaram melhores resultados para todos os OPs. Contudo, ao comparar com os resultados obtidos após 2 minutos de sonificação, observou-se que a eficiência de extração foi semelhante, mas com um tempo mais curto. Neste sentido, foi selecionado um tempo de retroextração de 2 minutos para os próximos ensaios de otimização, que ofereceu boa eficiência de extração e elevada precisão, com  $1,8 \% \leq \text{RSD} \leq 4,3 \%$ . Optou-se ainda por continuar a testar os dois solventes, *n*-C<sub>8</sub> e *n*-C<sub>9</sub>, nos ensaios seguintes, pois não se obtiveram resultados que justificassem a seleção de apenas um deles.

#### 4.3.3. Otimização da etapa de microextração

Concluída a otimização da fase de retroextração, prosseguiu-se para a otimização dos parâmetros que compõem a etapa de microextração. A eficiência da microextração depende do equilíbrio entre os analitos na fase aquosa e a fase extratora, sendo influenciada por parâmetros como a velocidade de agitação, o tempo de equilíbrio, a polaridade e a força iónica [67, 82].

##### 4.3.3.1 Efeito da velocidade de agitação

A velocidade de agitação representa um papel importante na influência da cinética de transferência dos analitos como também no comportamento cinético dos analitos para com a fase extratora, uma vez tratar-se de uma metodologia de extração por flutuação.

A velocidade ideal terá de maximizar a eficiência de extração, salvaguardando a integridade do mecanismo extrator. Tipicamente, uma velocidade de agitação mais elevadas favorece a transferência dos analitos da matriz para a fase extratora. No entanto, se a velocidade de agitação for excessiva, pode comprometer esse processo de transferência ao reduzir a área de contacto entre a matriz e solvente de extração, afetar a flutuação da fibra, gerar bolhas de ar na fibra, entre outras razões. Tal pode reduzir a eficiência de extração e, conseqüentemente, a precisão do método extrativo [65, 67]. Neste sentido foram realizados ensaios para cinco velocidades de extração: 800 rpm, 1000 rpm, 1200 rpm, 1400 rpm e 1600 rpm, com os solventes *n*-C<sub>8</sub> e *n*-C<sub>9</sub>.

Com base nos resultados obtidos (Figura 4.5) foi possível verificar que utilizar velocidades de agitação mais baixas (800 rpm, 1000 rpm e 1200 rpm), baixava significativamente a recuperação de todos os OPs. Este fenómeno pode ser explicado pela velocidade utilizada ser insuficiente para promover a difusão dos analitos presentes da matriz para a fase extratora. No entanto, ao testar a velocidade 1600 rpm, observou-se um aumento significativo na recuperação dos analitos clorpirifos e diazião, utilizando com o solvente o *n*-C<sub>8</sub>. Para os restantes analitos, esta velocidade não se destacou das restantes, no entanto, para os analitos metil-paratião e malatião, notou-se uma ligeira melhoria. Verificou-se um RSD entre 3,3 % e 7,3 % para o *n*-C<sub>8</sub> e, entre 2,8 % e 15,2 %, para o *n*-C<sub>9</sub>. Desta forma, optou-se por selecionar otimizar com 1600 rpm, que de uma forma geral proporcionou os resultados mais favoráveis, e decidiu-se prosseguir com os dois solventes.

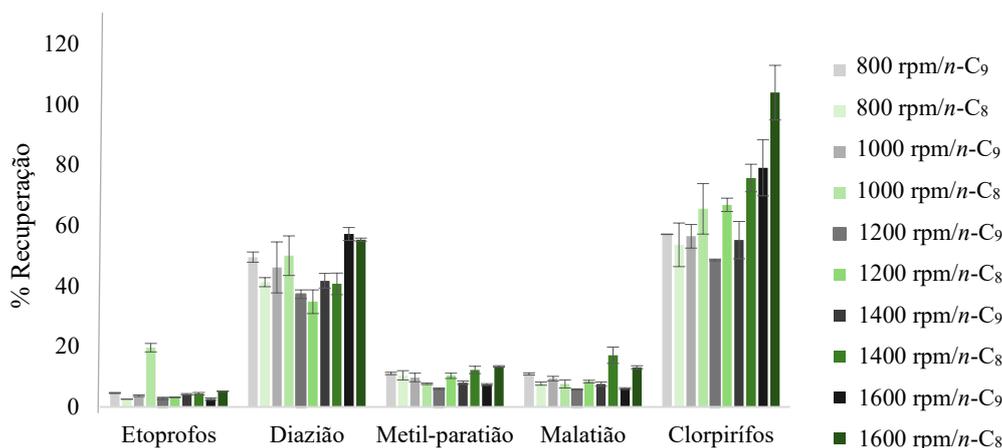


Figura 4.5- Efeito da velocidade de agitação na recuperação dos OPs em estudo, em meio aquoso, obtido por HF $\mu$ E- $\mu$ LD/GC-MS(SIM), utilizando os solventes de extração  $n-C_8$  e  $n-C_9$ . As análises foram efetuadas em triplicado. Condições experimentais: 1 h microextração; retroextração, 2 min sob tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio padrão de três replicados.

#### 4.3.3.2 Efeito do tempo de equilíbrio

Para otimizar esta etapa foram estudados diferentes tempos de equilíbrio: 1, 2, 3 e 4 h utilizando uma placa de agitação. A otimização deste parâmetro tem como objetivo assegurar uma recuperação eficiente durante o processo de extração, influenciada pela cinética do processo de transferência entre a matriz aquosa da amostra e o solvente presente no interior do aparelho de microextração. Uma vez que o tempo a que os analitos são expostos à cinética de extração é uma etapa crucial para a eficiência da extração. Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 4.6.

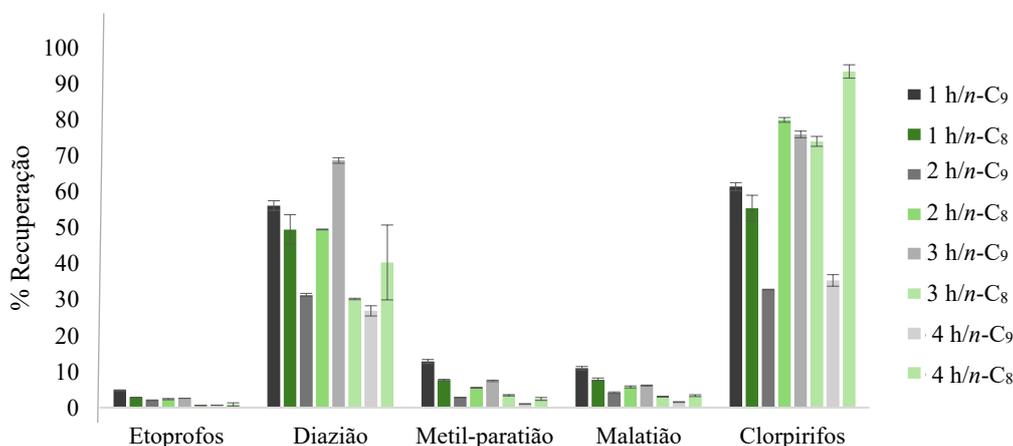


Figura 4.6- Efeito do tempo de equilíbrio na recuperação dos OPs em estudo, em meio aquoso, obtido por HF $\mu$ E- $\mu$ LD/GC-MS(SIM) utilizando os solventes de extração  $n-C_9$  e  $n-C_8$ . Ensaios realizados em triplicado. Condições experimentais: microextração, 1600 rpm; retroextração, 2 min sob tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio padrão de três replicados.

Tendo em conta os resultados obtidos foi possível observar um aumento da recuperação média quando a extração foi realizada a 1 e 3 horas. No entanto, utilizando 4 horas de extração, observou-se uma recuperação significativamente mais baixa de muitos dos OPs estudados, que poderá estar relacionada com a ocorrência do fenómeno *wall-effect*. Para os analitos etoprofos, metil-paratião e malatião, a melhor recuperação foi alcançada utilizando apenas 1 hora de extração, com ambos os solventes.

Embora a extração realizada durante 1 hora tenha demonstrado ser a mais eficiente para três dos analitos e também tenha permitido uma boa recuperação para os outros dois analitos alvo, decidiu-se realizar novos testes para confirmar se esta seria a opção ideal. Além disso, foi possível observar diferenças significativas entre os dois solventes testados. O solvente *n*-C<sub>8</sub> atingiu valores máximos de recuperação em 2 horas, enquanto o *n*-C<sub>9</sub> necessitou de 3 horas para atingir o seu valor máximo de recuperação. Com base nestes resultados, optou-se por continuar com ambos os solventes, realizando um teste adicional para avaliar o tempo de equilíbrio ideal. Este teste (Figura 4.7), consistiu em reavaliar a eficiência de extração utilizando *n*-C<sub>8</sub> durante 1 e 2 horas, e *n*-C<sub>9</sub> durante 3 horas.

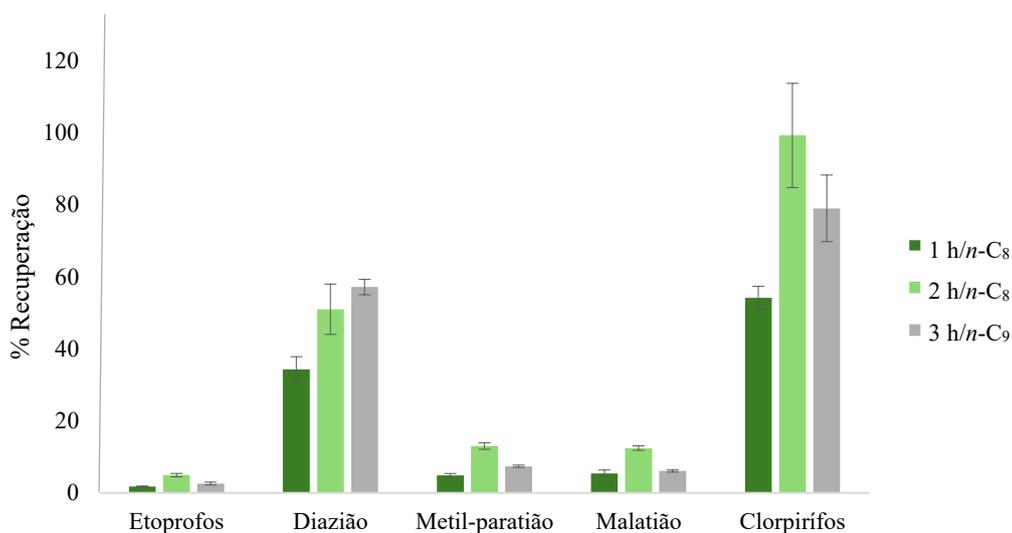


Figura 4.7- Estudo do tempo de equilíbrio nas seguintes condições: *n*-C<sub>8</sub>: 1 h e 2 h; *n*-C<sub>9</sub>: 3 h, na recuperação dos OPs em estudo, em meio aquoso, obtido por HF $\mu$ E- $\mu$ LD/GC-MS(SIM). As análises foram efetuadas em triplicado. As barras de erro representam o desvio padrão de três replicados.

Analisando os resultados apresentados verificou-se que as melhores recuperações foram alcançadas com 2 horas de extração, utilizando o *n*-C<sub>8</sub>, que apresentaram valores de RSD satisfatórios, entre 3,3 % e 14,9 %. Assim, foi selecionada 2 h de microextração para prosseguir com os restantes ensaios bem como o solvente *n*-C<sub>8</sub>.

#### 4.3.3.3 Efeito do modificador orgânico

A polaridade ou, o efeito do modificador orgânico, foi estudada uma vez que a extração pode ser influenciada por um fenômeno muito comum conhecido como “wall-effect”, no qual, o analito fica adsorvido às paredes do frasco de amostragem, condicionando a eficiência de extração [80].

A adição de um modificador orgânico, como o MeOH, altera a polaridade da matriz, tornando-a mais orgânica e aumentando a solubilidade dos analitos na fase aquosa, e minimizando a sua adsorção às paredes do frasco facilitando a sua extração [80, 82]. Este fenômeno tende a beneficiar a extração de analitos mais apolares, ou seja, com log  $K_{OW}$  elevados (log  $K_{OW}$  > 5). No entanto, a adição de concentrações excessivas de MeOH pode afetar o equilíbrio entre a matriz e o aparelho extrator, afetando a partição para o solvente de extração e comprometendo o processo extrativo [80, 82, 83].

Para avaliar o impacto do efeito do modificador orgânico, foram realizados ensaios adicionando MeOH 0, 5,10 e 15 % de MeOH, estando os resultados apresentados na Figura 4.8.

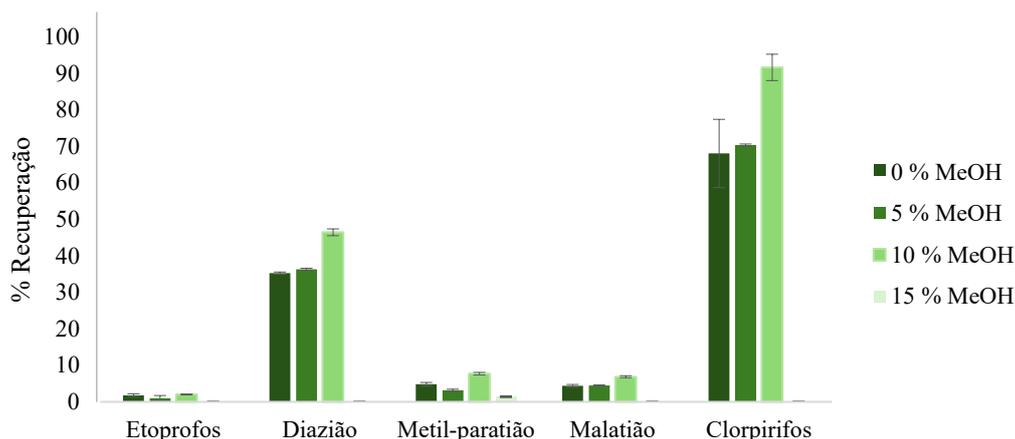


Figura 4.8- Efeito do modificador orgânico na recuperação dos OPs em estudo, em meio aquoso, obtido por HF $\mu$ E- $\mu$ LD/GC-MS(SIM). As análises foram efetuadas em triplicado. Condições experimentais: 2 h (1600 rpm); retroextração, 2 min sob tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio padrão de três replicados.

Observando os resultados obtidos foi possível notar que a adição de 10 % de MeOH destacou-se dos restantes resultados, evidenciando uma melhor extração dos cinco analitos em estudo. Para os analitos etoprofos, metil-paratião e malatião, notou-se que a diferença na recuperação entre a não adição e a adição de 10 % de MeOH foi reduzida ou até mesmo insignificante. O que seria expectável, uma vez que estes três compostos são os mais polares e por isso a adição de MeOH não irá beneficiar o seu processo extrativo.

Da mesma forma, o destaque na extração do clorpirifos com 10 % MeOH também era expectável por se tratar de um analito apolar. Os resultados sugerem ainda que a adição de uma maior quantidade de MeOH (15 %) comprometeu o processo extrativo de todos os OPs, apresentando valores de recuperação extremamente baixos (1,5 %) ou na impossibilidade de extrair alguns dos OPs. Assim, a adição de 10 % MeOH demonstra ser a alternativa mais eficiente na recuperação e por isso foi a selecionada para prosseguir com o trabalho.

#### 4.3.3.4 Efeito da força iónica

Outro parâmetro importante com grande influência no processo extrativo é o efeito da força iónica. Estes ensaios são conduzidos através da adição de um eletrólito, o NaCl, que gera um fenómeno conhecido por *salting-out*. A adição do NaCl, aumenta a força iónica na solução, aumentando a partição dos analitos e facilitando a sua migração para o mecanismo extrator, aumentando a eficiência de recuperação. Este fenómeno favorece principalmente compostos polares, ou seja, com  $\log K_{O/W}$  mais baixos [83-85].

Desta forma, os ensaios conduzidos consistiram na adição de 0, 5, 10 e 15 % de NaCl e os resultados estão apresentados na Figura 4.9.

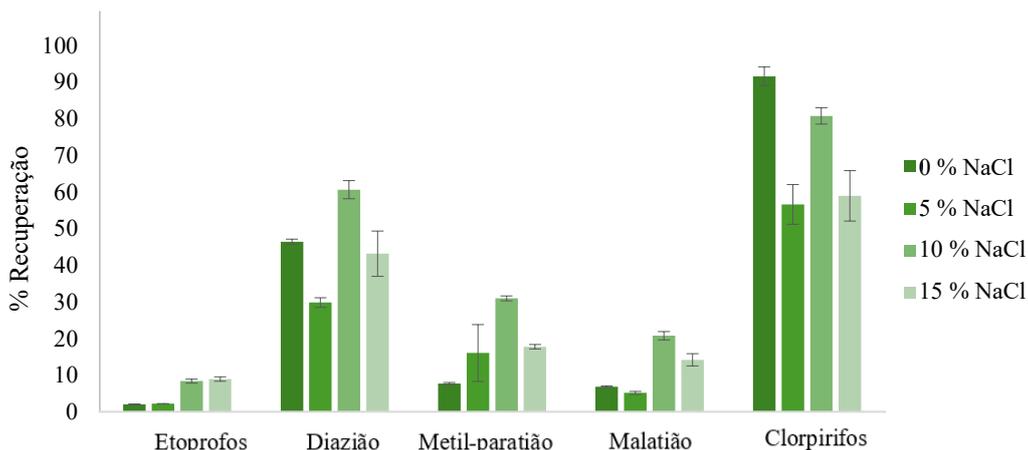


Figura 4.9- Efeito da força iônica da matriz na recuperação dos OPs em estudo, em meio aquoso, obtido por HF $\mu$ E- $\mu$ LD/GC-MS(SIM). As análises foram efetuadas em triplicado. Condições experimentais: 2 h (1600 rpm); retroextração, 2 min sob tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio padrão de três replicados.

A partir da análise do gráfico, com a adição de 10 % de NaCl observou-se uma melhoria na extração de todos os analitos à exceção do clorpirifos. Para este analito, os ensaios sem NaCl proporcionaram uma melhor recuperação, como era expectável, já que se trata de um analito apolar. Adicionalmente, verificou-se que a adição de 15 % NaCl teve um impacto negativo no processo de extração, resultando num decréscimo da recuperação de praticamente todos os analitos. Esta diminuição da eficiência de extração poderá ser justificada pelo aumento excessivo da solubilidade dos analitos na matriz aquosa, comprometendo a partição dos analitos para o mecanismo extrator.

Pelo contrário, a adição de 10 % NaCl mostrou-se a mais eficaz, demonstrando um adequado *salting-out*, que diminui a solubilidade dos analitos na matriz e facilita a sua extração. Assim sendo, seguiu-se a otimização com a adição de 10 % de NaCl.

#### 4.3.4. Efeito da *dual*-HF $\mu$ E

Por fim, como os analitos em estudo apresentam diferentes polaridades, e demonstraram ser influenciados de forma distinta pelos diferentes parâmetros de otimização decidiu-se estudar a aplicação do *dual*- HF $\mu$ E. Para tal, utilizaram-se simultaneamente duas membranas de HF $\mu$ E (*dual* HF $\mu$ E) por amostra, com o objetivo de aumentar a capacidade de extração e a seletividade do processo, seguindo as condições previamente otimizadas.

Primeiramente, começou-se pela utilização de dois dispositivos com o mesmo solvente, *n*-C<sub>8</sub>:*n*-C<sub>8</sub>, aumentando a cinética da microextração. De seguida, realizaram-se testes usando na mesma as duas membranas de HF $\mu$ E, mas cada uma com um solvente diferente, nomeadamente *n*-C<sub>8</sub>:DCM e *n*-C<sub>8</sub>:Tol. A otimização desta etapa foi efetuada usando uma mistura dos respetivos solventes (1:1, v/v; 100  $\mu$ L) [86].

De acordo com os resultados obtidos (Figura 4.10) verificou-se que a utilização da *dual n*-C<sub>8</sub>:*n*-C<sub>8</sub> não apresentou diferenças significativas nos resultados obtidos apresentando recuperações entre 14 % e 77 %. Destacando que essa combinação não teve particular influência nos compostos etoprofos, metil-paratônio e malatião, que tendem a demonstrar uma menor seletividade de extração desde o início da otimização, nomeadamente uma recuperação inferior a 40 %.

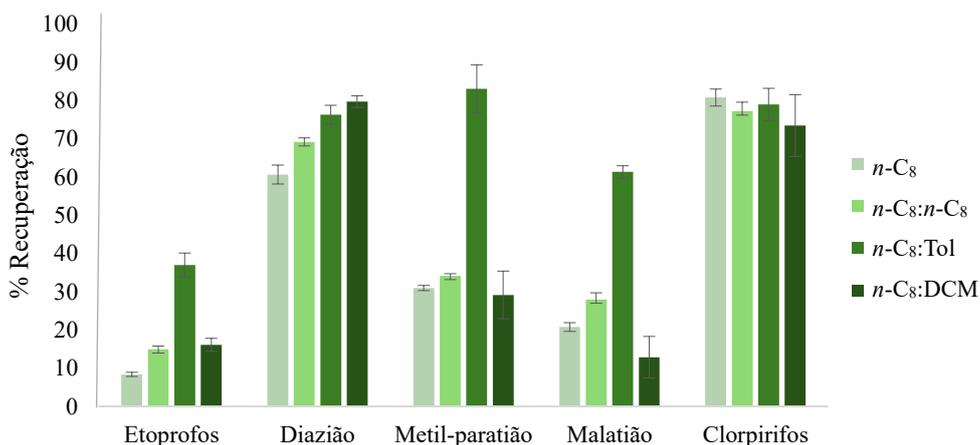


Figura 4.10- Efeito da *dual*-HF  $n\text{-C}_8:n\text{-C}_8$  e *dual*-HF com diferentes solventes ( $n\text{-C}_8:\text{Tol}$ ;  $n\text{-C}_8:\text{DCM}$ ) na recuperação dos OPs em estudo, em meio aquoso, obtido por HF $\mu\text{E}$ - $\mu\text{LD}$ /GC-MS(SIM). As análises foram efetuadas em triplicado. Condições experimentais: 2 h (1600 rpm); retroextração, 2 min sob tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio padrão de três replicados.

Da mesma forma a combinação *dual*  $n\text{-C}_8:\text{DCM}$  também não se destacou das restantes, com recuperações compreendidas entre 12 % e 79 %, nem promoveu uma melhor recuperação dos três analitos mencionados anteriormente, com recuperações inferiores a 30 %. Contudo, a utilização de *dual* com  $n\text{-C}_8:\text{Tol}$  demonstrou ter uma recuperação notável, com valores compreendidos entre 37 % e 83 %, permitindo aumentar a seletividade da extração dos analitos etoprofos, metil-paratião e malatião, que obtiveram recuperações de 37 %, 83 % e 61 % respectivamente, assim como manter os níveis de seletividade dos restantes analitos em estudo. Assim sendo, as melhores recuperações foram obtidas utilizando a *dual*  $n\text{-C}_8:\text{Tol}$ , para todos os analitos em estudo, apresentando ainda valores aceitáveis de RSD, entre 2,6 % e 8,4 %, sendo por isso os solventes selecionados.

Por fim, para confirmar a eficiência de extração dos parâmetros selecionados, efetuou-se uma análise extra que consistiu na análise de seis replicados aplicando as condições previamente selecionadas (Figura 4.11).

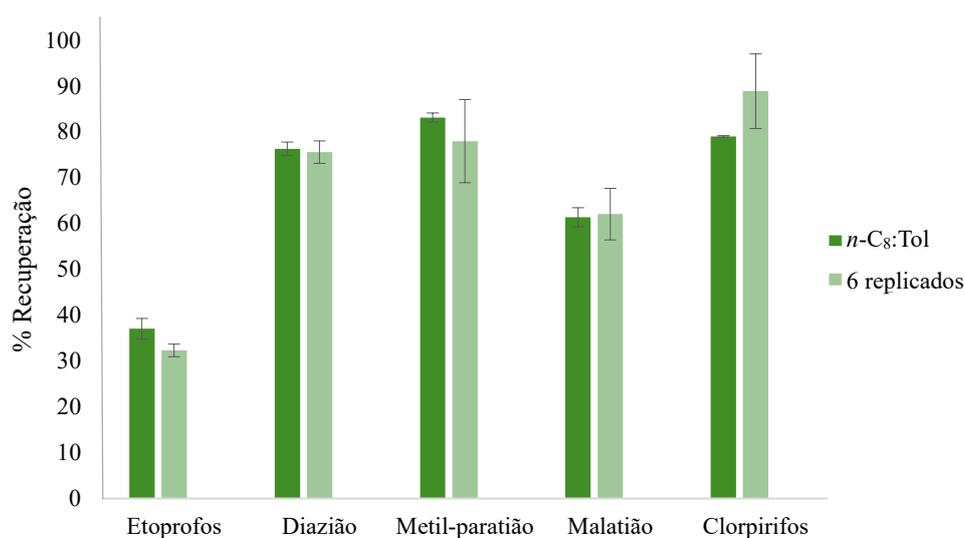


Figura 4.11- Parâmetros otimizados para a microextração por HF $\mu\text{E}$ - $\mu\text{LD}$ /GC-MS dos OPs em estudo, em meio aquoso. As análises foram efetuadas em seis replicados. Condições experimentais: ( $n\text{-C}_8:\text{Tol}$ ) 2 h (1600 rpm); retroextração, 2 min de tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio padrão de seis replicados.

Os resultados obtidos permaneceram concordantes com os apresentados previamente, permitindo obter recuperações entre 32 % e 88 %, com valores de RSD muito aceitáveis, entre 3,2 % e 11,6 %. Desta forma, ficaram estabelecidas as condições otimizadas apresentadas na Tabela 4.3, que serão utilizadas na validação da metodologia *dual*-HF $\mu$ E- $\mu$ LD/GC-MS(SIM).

Tabela 4.3- Resumo das condições otimizadas para o método desenvolvido.

Solventes de extração	<i>n</i> -C <sub>8</sub> :Tol; 1:1, v/v	
Microextração	Velocidade de agitação (rpm)	1600
	Tempo de equilíbrio (h)	2
	MeOH (%)	10
	NaCl (%)	10
Retroextração	Tempo (min)	2

#### 4.4. Validação da *dual*-HF $\mu$ E- $\mu$ LD/GC-MS(SIM)

Concluída a etapa de otimização, e determinadas as condições ótimas para a análise dos cinco OPs alvo, procedeu-se à validação da metodologia proposta. Nesta etapa foram avaliados os parâmetros: sensibilidade, linearidade, seletividade e precisão. Para o efeito, os ensaios foram realizados em 25 mL de água ultrapura sob as condições otimizadas, microextração: solvente *n*-C<sub>8</sub>:Tol; 1:1, v/v, 2 h (1600 rpm), 10 % MeOH, 10 % NaCl; retroextração: 2 minutos sob tratamento ultrassónico, fortificados com solução padrão dos OPs.

##### 4.4.1. Sensibilidade e linearidade

A sensibilidade do método foi avaliada através dos LODs e LOQs que foram determinados através da injeção sucessiva de soluções padrão com concentrações decrescentes, até que S/N atingisse uma razão de 3/1 de 10/1 respetivamente.

As retas de calibração foram construídas através da injeção de onze níveis de concentração, compreendidos entre 0,07 - 5,00  $\mu$ g/L, das quais foi possível obter coeficientes de determinação aceitáveis para os cinco OPs,  $r^2 \geq 0,9947$ . Na Tabela 4.4 é possível observar os resultados anteriormente mencionados.

A presente metodologia apresentou valores de LOD de 0,07  $\mu$ g/L para o etoprofos, de 0,03  $\mu$ g/L para o diazião e para o clorpirifos, de 0,05  $\mu$ g/L para o metil-paratião e de 0,10  $\mu$ g/L para o malatião. Relativamente ao LOQ, os analitos diazião e clorpirifos apresentaram o valor 0,07  $\mu$ g/L, o etoprofos 0,30  $\mu$ g/L, o metil-paratião 0,20  $\mu$ g/L e por fim, o malatião apresentou o valor mais elevado, de 0,50  $\mu$ g/L.

Tendo em conta a Diretiva (UE) 2020/2184, referente à água para consumo humano, verificou-se, individualmente, que apenas dois dos OPs estudados, nomeadamente o diazião e clorpirifos, atendem ao critério legal de um LOQ igual ou inferior a 0,10  $\mu$ g/L [53]. Assim, seria possível quantificar de

forma confiável a presença destes dois pesticidas numa amostra de água, e, com base nos resultados assegurar que o seu consumo seja seguro. Além disso, considerando o limite regulamentar para pesticidas totais, fixado num LOQ igual ou inferior a 0,50 µg/L, o conjunto dos cinco analitos também não atenderia à legislação, uma vez que a soma dos LOQs (1,14 µg/L) ultrapassa o valor permitido por lei.

Tabela 4.4- Gama linear e valores de LOD, LOQ e  $r^2$  das recuperações dos diferentes valores de fortificação em água ultrapura obtidos por dual-HFµE(*n*-C<sub>8</sub>:Tol)-µLD/LVI-GC-MS(SIM) sob condições experimentais otimizadas.

Analitos	Recuperação (%)	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)	Gama Linear (µg/L)	$r^2$
<b>Etoprofos</b>	40 %	0,07	0,30	0,07 – 5,00	0,9947
<b>Diazião</b>	72 %	0,03	0,07		0,9983
<b>Metil-Paratião</b>	78 %	0,05	0,20		0,9968
<b>Malatião</b>	61 %	0,10	0,50		0,9974
<b>Clorpirifos</b>	83 %	0,03	0,07		0,9983

Por sua vez, de acordo com o Decreto-Lei n.º 236/98, referente à monitorização de águas superficiais seria possível detetar e quantificar com confiança a presença de todos os pesticidas estudados, por apresentarem um LOQ igual ou inferior ao limite regulamentado de 0,5 µg/L, estabelecido para os pesticidas individuais [54]. Da mesma forma, para o conjunto dos cinco pesticidas analisados, a regulamentação referente ao limite total, fixado a 2,5 µg/L, seria cumprida, dado que o somatório dos LOQs (1,14 µg/L) encontra-se abaixo do valor estabelecido por lei.

#### 4.4.2. Seletividade e precisão

A seletividade do método foi avaliada através da aplicação da metodologia otimizada a amostras em branco, verificando-se, nos tempos de retenção dos cinco OPs, a ausência de possível interferente. Desta forma foi possível confirmar que o método de extração utilizado é seletivo para os analitos em estudo.

A precisão da metodologia foi também determinada através de ensaios de repetibilidade e precisão intermédia, calculada através do RSD (%) para cinco e três ensaios, respetivamente, apresentando três níveis de concentração, 0,5; 1,0 e 5,0 µg/L. Os ensaios de precisão intermédia foram realizados através de três replicados por dia em três dias consecutivos. Os ensaios de repetibilidade foram realizados no mesmo dia, por cinco replicados. Os resultados podem ser observados na Tabela 4.5.

Os resultados obtidos foram avaliados com base nos critérios estabelecidos pela Diretiva 98/83/CE, revogada pela Diretiva (UE) 2020/2184, mas cujos requisitos, incluindo o valor do RSD (%) ≤ 25%, permanecem válidos até que novas definições sejam estabelecidas [53, 87]. Desta forma, os valores obtidos demonstram bons níveis de repetibilidade, com RSD ≤ 18,8 % e, de precisão intermédia, com RSD ≤ 18,3 %, seguindo as condições experimentais otimizadas. Além disso, verificou-se uma boa

eficiência de extração para os cinco OPs, obtendo valores de recuperação compreendidos entre 40 % e 83 %.

Tabela 4.5- Valores de repetibilidade e precisão intermédia, expressos como RSD (%), das recuperações dos diferentes valores de fortificação, em água ultrapura, obtidos por dual-HF $\mu$ E(*n*-C<sub>8</sub>:Tol)- $\mu$ LD/LVI-GC-MS(SIM) sob condições experimentais otimizadas.

OPs	Nível de concentração ( $\mu$ g/L)	Intra-dia	Inter-dia
		Repetibilidade (RSD, %)	Precisão (RSD, %)
<b>Etoprofos</b>	5,0	7,6 %	11,1 %
	1,0	12,4 %	11,2 %
	0,5	17,9 %	15,7 %
<b>Diazião</b>	5,0	10,6 %	11,5 %
	1,0	15,2 %	15,3 %
	0,5	17,6 %	14,8 %
<b>Metil-paratião</b>	5,0	12,4 %	9,2 %
	1,0	15,6 %	9,9 %
	0,5	18,7 %	18,3 %
<b>Malatião</b>	5,0	14,4 %	10,2 %
	1,0	18,3 %	10,0 %
	0,5	18,8 %	15,1 %
<b>Clorpirifos</b>	5,0	12,4 %	9,2 %
	1,0	13,7 %	10,0 %
	0,5	11,1 %	16,1 %

#### 4.5. Aplicação do método a matrizes reais

A metodologia, dual-HF $\mu$ E (*n*-C<sub>8</sub>:Tol)- $\mu$ LD/LVI-GC-MS(SIM), previamente otimizada e validada, foi aplicada a matrizes reais para demonstrar a sua eficácia. As matrizes reais, por serem amostras complexas, permitem avaliar a capacidade analítica da metodologia. Para quantificação e de modo a reduzir o efeito matriz, utilizou-se o método de adição padrão (SAM, do inglês *Standard Addition Method*), que consiste na fortificação das amostras reais com soluções padrão contendo os analitos em estudo. Desta forma, foram analisadas diferentes matrizes reais, nomeadamente amostras de água de torneira, de estuário e de ETAR, fortificadas com 100  $\mu$ L de soluções padrão preparadas em quatro níveis de concentração, compreendidos entre 0,25 – 5,00 mg/L. Antes da fortificação, não foi identificado nenhum caso de contaminação natural nas matrizes reais, isto é, nenhum dos cinco OPs foi detetado em nenhuma das matrizes estudadas, como era esperado, uma vez que quatro destes pesticidas já estão proibidos na União Europeia. Para garantir o controlo da metodologia analítica, foram realizadas análises de brancos.

Nas tabelas 4.6 e 4.7 encontram-se descritos os resultados obtidos nestes ensaios, incluindo os valores de  $r^2$  e as eficiências de extração para os cinco OPs.

Tabela 4.6- Valores de recuperação média (R (%) ± RSD (%)) para os cinco OPs em estudo em amostras de água de ETAR, de torneira e de estuário (Porto Brandão) pelo método SAM, sob as condições experimentais otimizadas e validadas.

Compostos	Recuperação (%) ± RSD (%)		
	Água da torneira	Água de estuário	Água de ETAR
<b>Etoprofos</b>	31,1 ± 5,7	28,1 ± 7,4	30,6 ± 8,7
<b>Diazião</b>	74,1 ± 4,0	73,1 ± 2,1	75,0 ± 9,1
<b>Metil-Paratião</b>	71,1 ± 8,3	67,4 ± 10,1	71,7 ± 8,4
<b>Malatião</b>	63,6 ± 7,0	49,9 ± 4,7	63,1 ± 12,0
<b>Clorpirifos</b>	87,7 ± 4,6	85,4 ± 8,2	88,7 ± 9,3

Tabela 4.7- Valores de  $r^2$  para os cinco OPs em estudo em amostras de água de ETAR, de torneira e de estuário (Porto Brandão) pelo método SAM, sob as condições experimentais otimizadas e validadas.

Compostos	$r^2$		
	Água de Torneira	Água de estuário	Água de ETAR
<b>Etoprofos</b>	0,9988	0,9976	0,9997
<b>Diazião</b>	0,9966	0,9953	0,9987
<b>Metil-Paratião</b>	0,9976	0,9983	0,9970
<b>Malatião</b>	0,9945	0,9977	0,9935
<b>Clorpirifos</b>	0,9995	0,9989	0,9964

Os resultados obtidos apresentaram boa linearidade ( $r^2 > 0,9935$ ) além de evidenciarem a elevada seletividade e sensibilidade do método. No Anexo III, apresentam-se os cromatogramas das amostras de água de torneira, água de estuário e água de ETAR fortificadas (2,5 mg/L) e analisadas pela metodologia proposta, já otimizada e validada.

#### 4.6. Comparação com outras técnicas de microextração

Os resultados obtidos através da metodologia analítica proposta, otimizada e validada, foram comparados com dados relatados na literatura sobre a extração de OPs utilizando diferentes técnicas de microextração, como HF-LPME, LPME, SPME e SBSE (Tabela 4.8).

Tabela 4.8- Comparação entre diferentes técnicas de microextração usadas na análise de OPs. (O sinal (-) indica que a técnica não possui a propriedade; o sinal (+) indica que a técnica possui a propriedade).

	HF-LPME	LPME	SPME	SBSE	HF $\mu$ E
<b>Tempo de Equilíbrio</b>	30 min	20 min	40 min	60 min	120 min
<b>LODs (<math>\mu</math>g/L)</b>	0,04-0,44	20	0,03-0,05	0,01-0,24	0,03-0,10
<b>Recuperação (%)</b>	110 - 115	45	96 - 102	42	40 - 83
<b>Vantagens e desvantagens</b>					
<b>Fácil utilização</b>	-	+	-	+	+
<b>Química verde</b>	+	+	+	+	+
<b>Custo-benefício</b>	+	+	-	-	+
<b>Análise de rotina</b>	-	-	+	+	+
<b>Extrair compostos polares e apolares</b>	+	+	+	-	+
<b>Referência</b>	[88]	[89]	[90]	[91]	Presente trabalho

A técnica HF-LPME é reconhecida pela sua elevada seletividade e eficácia na extração de misturas complexas, abrangendo tanto compostos polares como apolares. No entanto, apresenta limitações operacionais que podem dificultar a sua aplicação em análises de rotina. O processo de injeção do solvente na membrana e consequente remoção exige um elevado nível de conhecimento técnico, o que pode constituir um desafio para operadores menos experientes. Além disso, a fragilidade da fibra oca torna-se suscetível a danos durante o manuseio, podendo resultar na perda de solvente e comprometer a eficiência da extração. A tabela apresentada, inclui dados de Menezes, H. C. et al. (2016), que aplicaram esta técnica na análise de diferentes classes de pesticidas, entre as quais dois OPs estudados no presente projeto, o metil-paratião (polar, obtida uma recuperação de 110 %) e o clorpirifos (apolar, obtida uma recuperação de 115 %), tendo usado octanoato de etilo como solvente de extração [88]. Por outro lado, a técnica LPME, embora apresente um tempo de equilíbrio menor, é limitada quando se pretendem extrair amostras complexas, devido à presença de possíveis interferentes na matriz. Além disso, por não estar disponível comercialmente dificulta a sua aquisição e aplicações nas metodologias laboratoriais padronizadas ou em análises em grande escala. Os dados apresentados por Khalili-Zanjani, M. R. et al. (2008) provêm de um projeto focado no estudo de OPs, dos quais apenas o metil-paratião (45 %) coincidia com os compostos deste trabalho. Nesse estudo, foram analisados apenas compostos semi-polares, o que facilitou o processo extrativo, sendo utilizado 1-undecanol como solvente de extração [89].

Tanto a técnica SPME como SBSE são amplamente utilizadas na extração de pesticidas em diferentes matrizes, permitindo uma excelente recuperação dos analitos, sendo também duas técnicas integrantes da química verde. Contudo, a SPME apresenta limitações, como uma capacidade extrativa limitada pelo material de revestimento da fibra e a necessidade de conhecimento técnico do operador durante o

acondicionamento da fase sorvente. Além disso, a técnica pode danificar os sistemas instrumentais, uma vez todos os compostos extraídos, incluindo interferentes, possam ser injetados diretamente no sistema analítico, resultando na transferência de substâncias indesejadas. Os resultados apresentados por Sapahin, H. A. et al. (2019) foram obtidos num estudo sobre OPs em água, permitindo obter uma recuperação de 101 % para o diazião, de 96 % para o metil-paratião, de 98 % para o malatião e de 102 % para o clorpirifos [90].

Por sua vez, a técnica SBSE utiliza um revestimento limitado a um único polímero, o PDMS, o que limita a sua seletividade, extraindo principalmente compostos com polaridade intermédia, embora também consiga extrair compostos levemente polares. Os resultados apresentados na Tabela 4.9 referem-se a um estudo realizado por Peñalver, A. et al. (2003) focado na monitorização de disruptores químicos endócrinos presentes em amostras de água, incluindo o malatião (42 %), um analito também estudado no presente trabalho [91]. Apesar do malatião ser polar, a sua estrutura contém uma parte hidrofóbica (cadeia hidrocarbonada) que pode interagir com o PDMS. No entanto, essa técnica não seria a mais indicada para a análise deste composto.

Por fim, a técnica estudada, a HF $\mu$ E, ao ser aplicada a um mais alargado número de pesticidas, demonstrou uma elevada eficiência analítica, além de apresentar uma ótima relação custo-benefício, facilidade de manipulação e aplicabilidade em trabalhos de rotina. Destacou-se na extração dos OPs devido à elevada seletividade, eficiência e capacidade de minimizar interferentes, superando as alternativas SPME, LPME e SBSE. A HF $\mu$ E permite um controle preciso das condições de extração, utilizando uma membrana oca seletiva que protege o solvente e enriquece os analitos-alvo, garantindo uma elevada recuperação, mesmo em concentrações vestigiais. Para além disso, a sua versatilidade e flexibilidade torna esta técnica facilmente adaptável a diferentes matrizes e analitos, incluindo compostos com diversas polaridades. Em suma, a HF $\mu$ E demonstrou ser uma técnica inovadora, eficiente e altamente sustentável, adequada para atender às atuais exigências das análises ambientais como foi o caso do presente estudo dos OPs.

Relativamente aos valores obtidos neste projeto, apresentados na Tabela 4.9, ao analisarmos por analito, para o malatião foi possível obter uma recuperação média de 61 %, superior à obtida com a técnica SBSE. Para o metil-paratião, a recuperação média foi de 78 %, também mais elevada que a recuperação obtida com a LPME. Quando comparados com os resultados da técnica HF-LPME, os valores obtidos foram inferiores: para o clorpirifos, a recuperação média foi de 83 % e para o metil-paratião, de 78 %. Contudo, é importante destacar que os resultados deste projeto foram fortemente influenciados por diversos problemas instrumentais que ocorreram no decorrer do projeto. Acreditamos que, caso a metodologia final desenvolvida tivesse sido aplicada sem essas condicionantes, os valores de recuperação seriam consideravelmente mais elevados.

## 5. Conclusões e perspectivas futuras

O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de uma metodologia analítica inovadora, baseada na HF $\mu$ E/GC-MS(SIM), para monitorização de cinco pesticidas organofosforados (etoprofos, diazião, metil-paratião, malatião e clorpirifos) em matrizes aquosas.

Após a otimização instrumental, procedeu-se à otimização (utilizando o modo de injeção SL) e validação (com o injetor PTV) do método de extração HF $\mu$ E- $\mu$ LD. Este processo consistiu no estudo de diversos parâmetros que poderiam interferir com as etapas de microextração e retroextração. Durante o estudo do solvente de extração o *n*-C<sub>8</sub> foi selecionado inicialmente, no entanto, testando a possibilidade de utilizar a *dual*-HF $\mu$ E, a utilização de duas fibras com uma mistura *n*-C<sub>8</sub>:Tol (50:50; v/v), demonstrou uma maior eficiência como seletividade de extração dos cinco OPs. As condições otimizadas para a extração dos cinco OPs foram: microextração: solvente *n*-C<sub>8</sub>:Tol; 1:1, v/v, 2 h (1600 rpm), 10 % MeOH, 10 % NaCl; retroextração: 2 min sob tratamento ultrassónico, utilizando 100  $\mu$ L de solvente *n*-C<sub>8</sub>:Tol; 1:1, v/v. Com os parâmetros otimizados foi possível alcançar recuperações médias compreendidas entre 40 % e 83 % para os cinco OPs.

De seguida, procedeu-se à validação do método analítico em água ultrapura, utilizando o injetor PTV. Foi possível obter LODs entre 0,03 e 0,10  $\mu$ g/L e LOQs entre 0,07 e 0,50  $\mu$ g/L. O estudo da linearidade permitiu concluir que na gama de trabalho compreendida entre 0,07 e 5,00  $\mu$ g/L, o método evidenciou boa linearidade para todos os compostos, verificada através dos coeficientes de determinação ( $r^2 \geq 0,9947$ ). A seletividade do método extrativo foi confirmada pela ausência de picos nos tempos de retenção correspondentes aos cinco OPs em estudo. Os valores de precisão e repetibilidade variaram entre 9,2 e 18,3 % e 7,6 e 18,8 %, respetivamente, estando todos de acordo com a Diretiva 98/83/CE que define que o RSD (%) deve ser  $\leq 25$  %.

Ao comparar os resultados obtidos com a legislação aplicável à água de consumo humano, verificou-se que apenas dois dos analitos, nomeadamente o diazião e o clorpirifos, cumprem os critérios estabelecidos na Diretiva (UE) 2020/2184, para limites individuais (LOQ  $\leq 0,1$   $\mu$ g/L). Contudo, relativamente ao critério para a pesticidas totais (LOQ  $\leq 0,5$   $\mu$ g/L), o valor obtido utilizando a técnica desenvolvida foi 1,14  $\mu$ g/L, superando assim o valor permitido por lei. Assim, os métodos utilizados, embora adequados para algumas aplicações, requerem maior sensibilidade analítica para atender às exigências da legislação mais restritiva referente à água potável. Por outro lado, em comparação com a legislação para águas superficiais, definida pelo Decreto-Lei n.º 236/98, de 1 de agosto, todos os resultados atendem ao critério definido. Foi possível identificar individualmente os cinco pesticidas cujos LOQs (0,07; 0,20; 0,30 e 0,50  $\mu$ g/L) são inferiores ou iguais ao valor máximo admissível de 0,5  $\mu$ g/L. Da mesma forma, o somatório dos LOQs de todos os pesticidas está de acordo com limite regulamentar para pesticidas totais, nomeadamente, o valor obtido de 1,14  $\mu$ g/L para os pesticidas totais estudados é inferior ao valor limite estabelecido por lei de 2,5  $\mu$ g/L.

Para avaliar a capacidade analítica da metodologia validada, esta foi aplicada a matrizes reais, nomeadamente água de ETAR, de torneira e de estuário (Porto Brandão). Através do método de adição padrão as amostras foram fortificadas com soluções com concentrações conhecidas dos cinco analitos-alvo entre 0,25 e 5 mg/L. Para a água de torneira, registaram-se recuperações médias compreendidas entre 31,1 e 87,7 % (RSD  $\leq 8,3$  %;  $r^2 \geq 0,9945$ ). Na água de estuário, do Porto Brandão, as recuperações médias variaram entre 28,1 e 85,4 % (RSD  $\leq 10,1$  %;  $r^2 \geq 0,9953$ ). Para a água de ETAR, as recuperações médias situaram-se entre 30,6 e 88,7 % (RSD  $\leq 12,0$  %;  $r^2 \geq 0,9935$ ). Desta forma, o método demonstrou ser eficaz na deteção e quantificação dos cinco OPs como também a sua robustez quando aplicado a diferentes matrizes aquosas.

Posteriormente, através da comparação dos resultados obtidos neste projeto com os da literatura foi possível concluir que algumas das técnicas de microextração relatadas apresentaram LODs ligeiramente inferiores e tempos de equilíbrio menores. Contudo, a HF $\mu$ E destacou-se pela elevada seletividade, que contribuiu para a robustez do procedimento instrumental, e pela simplicidade e capacidade para microextrair simultaneamente cinco pesticidas com polaridades distintas.

Em suma, os objetivos propostos foram alcançados, nomeadamente desenvolver, otimizar e validar uma metodologia alternativa que demonstrasse ser eficaz para a monitorização vestigial de cinco OPs, e consequente aplicação em matrizes reais. A metodologia proposta destacou-se pela grande seletividade, sensibilidade na análise dos cinco OPs, demonstrando ainda de uma técnica simples, com um baixo custo associado e um impacto ambiental negligenciável.

Numa perspetiva futura, seria recomendável replicar esta metodologia, agora otimizada, em condições instrumentais mais estáveis, para avaliar melhor a sensibilidade da técnica. Além disso, seria interessante comparar a HF $\mu$ E com outras técnicas, como a BA $\mu$ E, que permite utilizar diferentes fases sorventes que podem ser vantajosas para o estudo dos analitos-alvo em questão, que apresentam polaridades distintas. Seria igualmente relevante aplicar a HF $\mu$ E a novas matrizes aquosas, como água de rega e água do mar, para avaliar o efeito matriz nessas condições específicas. Seria também interessante validar a metodologia otimizada neste trabalho em diferentes matrizes alimentares (ex: vinho) e biológicas (ex: urina) para avaliar a estabilidade destes compostos no ambiente bem como o seu processo de metabolização no organismo humano, o que poderia ser útil como método de deteção de possíveis contaminações.

## Bibliografia

- [1] Carmo, R. M. (2010). A agricultura familiar em Portugal: rupturas e continuidades. *RESR*, 48(1), 9-22. <https://doi.org/10.1590/s0103-20032010000100001>
- [2] Armenova, N., Tsigoriyna, L., Arsov, A., Petrov, K., & Petrova, P. (2023). Microbial detoxification of residual pesticides in fermented foods: Current status and prospects. *Foods*, 12(6), 1163. <https://doi.org/10.3390/foods12061163>
- [3] Braga, V, S, M. (2020). *Gestão de risco no uso de pesticidas : uma análise jurídica no Brasil e na União Europeia*. [Dissertação de mestrado, Faculdade de Direito da Universidade de Lisboa]. Repositório da Universidade de Lisboa. <http://hdl.handle.net/10451/52763>
- [4] Karpouzias, D. G.; & Singh, B. K. (2006). Microbial degradation of organophosphorus xenobiotics: Metabolic pathways and molecular basis. *Advances in Microbial Physiology. Academic Press*, 51, 119–225. [https://doi.org/10.1016/s0065-2911\(06\)51003-3](https://doi.org/10.1016/s0065-2911(06)51003-3)
- [5] Hashmi, M. Z., & Strezov, V. (2023). *Emerging contaminants and associated treatment technologies*. Springer. [https://www.springer.com/series/16185?srsId=afmboopzhno30jcr\\_s03big5ufcwbaw4kd3pobzo7sir7s2kafa3btiq](https://www.springer.com/series/16185?srsId=afmboopzhno30jcr_s03big5ufcwbaw4kd3pobzo7sir7s2kafa3btiq)
- [6] Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2024) *Pesticide use and trade: 1990-2022*. <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/a8a8c2c8-ee36-42e8-a619-7e73c8daf8a6/content>
- [7] José, M., & Santos, P. L. (n.d.). Evolução do sector agrícola português após a adesão à União Europeia. <https://sper.pt/oldsite/vcher/pdfs/majosasant.pdf>
- [8] Comissão Europeia (2023) A política agrícola comum (PAC) de relance. Portal da Agricultura da União Europeia. [https://agriculture.ec.europa.eu/common-agricultural-policy/cap-overview/cap-glance\\_pt](https://agriculture.ec.europa.eu/common-agricultural-policy/cap-overview/cap-glance_pt)
- [9] Diretiva n.º 91/414/CEE, de 15 de julho de 1991. (1991). Conselho das Comunidades Europeias, JO L 230, 1-32. EUR-Lex. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/pt/all/?uri=celex%3a3199110414>
- [10] Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2024) FAOSTAT. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/rp>
- [11] Regulamento n.º 1107/2009/CE Regulamento relativo à colocação dos produtos fitofarmacêuticos no mercado. (2009). Parlamento Europeu e do Conselho da União Europeia. JO L 309, 1-50. EUR-Lex. [https://eur-lex.europa.eu/legal-content/pt/all/?uri=oj:jo1\\_2009\\_309\\_r\\_0001\\_01](https://eur-lex.europa.eu/legal-content/pt/all/?uri=oj:jo1_2009_309_r_0001_01)
- [12] Diretiva n.º 2009/128/CE, de 21 de outubro de 2009. (2009). Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia. JO L 309, 71-86. EUR-Lex. <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2009/128/oj?locale=pt>
- [13] Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. (2020). *Estratégia farm to Fork: Do Prado ao Prato para um sistema alimentar justo, saudável e ecológico*. ASAE. Retirado a 18 de outubro de 2024 de <https://www.asae.gov.pt/newsletter2/asaenews-n-120-junho-2029/estrategia-farm-to-fork-do-prado-ao-prato-para-um-sistema-alimentar-justo-saudavel-e-ecologico.aspx>
- [14] Ore, O. T., Adeola, A. O., Bayode, A. A., Adedipe, D. T., & Nomngongo, P. N. (2023). Organophosphate pesticide residues in environmental and biological matrices: Occurrence, distribution

and potential remedial approaches. *Environ Chem Ecotoxicol*, 5, 9–23. <https://doi.org/10.1016/j.enceco.2022.10.004>

[15] Sánchez-Santed, F., Colomina, M. T., & Herrero Hernández, E. (2016). Organophosphate pesticide exposure and neurodegeneration. *Cortex*, 74, 417–426. <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2015.10.003>

[16] Neylon, J., Fuller, J. N., van der Poel, C., Church, J. E., & Dworkin, S. (2022). Organophosphate insecticide toxicity in neural development, cognition, behaviour and degeneration: Insights from zebrafish. *J Dev Biol*, 10(4), 49. <https://doi.org/10.3390/jdb10040049>

[17] World Health Organization. (2020). *The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2019*. World Health Organization. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/332193/9789240005662-eng.pdf>

[18] United Nations. (2023). *Globally harmonized system of classification and labelling of chemicals (GHS)* (10th ed.). United Nations Economic Commission for Europe. <https://unece.org/transport/dangerous-goods/ghs-rev10-2023>

[19] Karpouzias, D. G., & Singh, B. K. (2006). Microbial degradation of organophosphorus xenobiotics: Metabolic pathways and molecular basis. *Advances in Microbial Physiology*, 51 (119–225). John Wiley & Sons, Inc. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(06\)51003-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(06)51003-3)

[20] Jaipieam, S., Visuthismajarn, P., Sutheravut, P., Siriwong, W., Thoumsang, S., Borjan, M., & Robson, M. (2009). Organophosphate pesticide residues in drinking water from artesian wells and health risk assessment of agricultural communities, Thailand. *HERA*, 15(6), 1304–1316. <https://doi.org/10.1080/10807030903306984>

[21] Salinas, A. K., Kroll, K. J., & Denslow, N. D. (2022). Impacts of glyphosate herbicide and glyphosate-based formulations on aquatic ecosystems. *Front Environ Sci*, 34(5), 458-479. <https://doi.org/10.1002/jat.2997>

[22] Regulamento de Execução n.º 2019/344 da Comissão relativo à não renovação da aprovação da substância ativa etoprofos, em conformidade com o Regulamento (CE) n.º 1107/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho relativo à colocação dos produtos fitofarmacêuticos no mercado, e que altera o anexo do Regulamento de Execução (UE) n.º 540/2011 da Comissão. (2019). *Jornal Oficial da União Europeia* L 62, 7-9. EUR-Lex. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/pt/txt/html/?uri=celex:32019r0344>

[23] Decisão da Comissão n.º 2007/393/CE, de 6 de Junho de 2007, relativa à não inclusão da substância activa diazinão no anexo I da Directiva 91/414/CEE do Conselho e à retirada das autorizações dos produtos fitofarmacêuticos que a contenham. (2007). *Jornal Oficial da União Europeia* L 148, 9-10. EUR-Lex. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/en/all/?uri=celex%3a32007d0393>

[24] Decisão da Comissão n.º 2003/166/CE, de 10 de Março de 2003, relativa à não inclusão da substância activa paratíio-metilo no anexo I da Directiva 91/414/CEE do Conselho e à revogação das autorizações dos produtos fitofarmacêuticos que a contenham (2003). *Jornal Oficial da União Europeia* L 67, 18-19. EUR-Lex. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/en/all/?uri=celex%3a32003d0166>

[25] Regulamento de Execução da Comissão n.º 2018/1495/UE, de 8 de outubro de 2018, que diz respeito à autorização de produtos fitofarmacêuticos contendo a substância activa malatião (2018). *Jornal Oficial da União Europeia* L 253, 1-4. EUR-Lex. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/en/txt/?qid=1539249034585&uri=celex:32018r1495>

- [26] Regulamento n.º 2020/18, de 10 de janeiro de 2020, relativo à não renovação da aprovação da substância ativa clorpirifos, em conformidade com o Regulamento (CE) n.º 1107/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho relativo à colocação dos produtos fitofarmacêuticos no mercado, e que altera o anexo do Regulamento de Execução (UE) n.º 540/2011 da Comissão (2020). *Jornal Oficial da União Europeia* L 7, 14-16. EUR-Lex. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/pt/txt/?uri=celex:32020r0018>
- [27] Leitão, S., Moreira-Santos, M., Van den Brink, P. J., Ribeiro, R., Cerejeira, M. J., & Sousa, J. P. (2014). Ethoprophos fate on soil–water interface and effects on non-target terrestrial and aquatic biota under Mediterranean crop-based scenarios. *Ecotoxicol Environ Saf*, 103, 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.01.029>.
- [28] Pesticide Properties DataBase (PPDB). (2024). Ethoprofos. Universidade de Hertfordshire. Retirado a 9 de dezembro de <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/reports/279.htm>
- [29] Van der Velde-Koerts, T., & Ossendorp, B. C. (n.d.). *Ethoprofos (149)*. National Institute for Public Health and the Environment (RIVM). Retirado a 9 de dezembro de 2024 de <https://www.fao.org/docrep/pdf/009/a0186e/a0186e01.pdf>
- [30] National Center for Biotechnology Information (2025). *PubChem Compound Summary for CID 3289, Ethoprophos*. Retirado a 9 de dezembro de 2024 de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ethoprophos>
- [31] Cox, C. (2000) Inseticide factsheet: Diazinon toxicology. *J pestic reform*, 20(2), 14-20. <https://www.wolf.sk/dok/pesticidy/diazinontox.pdf>
- [32] USAID. (2013). *Technical Bulletin: Agrochemical General Information Sheet – Diazinon*. Cambodia HARVEST. Retirado a 15 de dezembro de 2024 de [https://pdf.usaid.gov/pdf\\_docs/pa00k8z2.pdf](https://pdf.usaid.gov/pdf_docs/pa00k8z2.pdf)
- [33] Lewis, K.A., Tzilivakis, J., Warner, D. and Green, A. (2016) An international database for pesticide risk assessments and management. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 22(4), 1050-1064. <https://doi.org/10.1080/10807039.2015.1133242>
- [34] National Center for Biotechnology Information. (2025). *Diazinon*. PubChem Compound Summary. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3017#section=special-reports>
- [35] Firozjaee, T. T., Mehrdadi, N., Baghdadi, M., & Nabi Bidhendi, G. R. (2017). The removal of diazinon from aqueous solution by chitosan/carbon nanotube adsorbent. *Desalination and Water Treatment* 79 (291–300). Elsevier. <https://doi.org/10.5004/dwt.2017.20794>
- [36] Kretschmann, A., Ashauer, R., Preuss, T. G., Spaak, P., Escher, B. I., & Hollender, J. (2011). Toxicokinetic model describing bioconcentration and biotransformation of diazinon in *Daphnia magna*. *Environ Sci Technol*, 45(11), 4995–5002. <https://doi.org/10.1021/es104324v>
- [37] ATSDR. (2003). *Toxicological profile for methyl parathion (TP-48)*. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Retirado a 10 de dezembro de 2024 de <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp48-c6.pdf>
- [38] Universidade de Hertfordshire. (2024). Methyl parathion. *Pesticide Properties DataBase (PPDB)*. Retirado a 10 de dezembro de 2024 de <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/reports/507.htm>

- [39] National Center for Biotechnology Information (2025). *PubChem Compound Summary for CID 4130, Methyl parathion*. Retirado a 10 de dezembro de 2024 de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/methyl-parathion>
- [40] Edwards, F. L., & Tchounwou, P. B. (2005). Environmental toxicology and health effects associated with methyl parathion exposure – A scientific review. *Int J Environ Res Public Health*, 2(3), 430-441. <https://doi.org/10.3390/ijerph2005030007>
- [41] Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2001). *Toxicological profile for methyl parathion*. Department of Health and Human Services, Public Health Service. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/nbk600341>
- [42] Jokanović, M., & Maksimović, M. (2012). *Toxicology - New Aspects to This Scientific Conundrum* (pp. 229-260). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/62600>
- [43] Pesticide Properties DataBase (PPDB). (2024). *Malathion*. Universidade de Hertfordshire. Retirado a 10 de dezembro de 2024 de <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/reports/421.htm>
- [44] Badr, A. M. (2020). Organophosphate toxicity: Updates of malathion potential toxic effects in mammals and potential treatments. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(15), 18509-18518. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08937-4>
- [45] PubChem. (2025). *Malathion*. National Center for Biotechnology Information. Retirado a 10 de dezembro de 2024 de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4004#section=toxicity-summary>
- [46] Jensen, I. M., & Whatling, P. (2010). *Malathion: A review of toxicology*. In *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology* (3<sup>a</sup> ed., pp. 1527-1542). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374367-1.00071-9>
- [47] Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2001). *Toxicological profile for malathion: Relevance to public health*. National Center for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/nbk600341>
- [48] National Environment Protection Council. (2002). *Environmental risk assessment guidance manual: Agricultural and veterinary chemicals*. National Environment Protection Council. <https://www.nepc.gov.au/sites/default/files/2022-09/cmgt-nchem-eragm-agricultural-and-veterinary-chemicals-200902.pdf>
- [49] National Center for Biotechnology Information (2025). *PubChem Compound Summary for CID 2730, Chlorpyrifos*. Retirado a 10 de dezembro de 2024 de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/chlorpyrifos>
- [50] Giesy, J. P., & Solomon, K. R. (2014). *Environmental Contamination and Toxicology-Ecological risk assessment for chlorpyrifos in terrestrial and aquatic systems in the United States* (Vol. 231). Society of Environmental Toxicology and Chemistry.
- [51] Watts, M. (2012). Chlorpyrifos as a possible global persistent organic pollutant (POP). *Pesticide Action Network North America*. [https://www.rapaluruquay.org/sitio\\_1/agrotoxicos/chlorpyrifos\\_as\\_pop.pdf](https://www.rapaluruquay.org/sitio_1/agrotoxicos/chlorpyrifos_as_pop.pdf)
- [52] University of Hertfordshire. (2024). Pesticide properties data base (PPDB): Chlorpyrifos. Retirado a 10 de dezembro de 2024 de <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/reports/154.htm>

- [53] Diretiva n.º 2020/2184/EU, de 16 de dezembro de 2020 Diretiva relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano (2020). Parlamento Europeu e do Conselho da União Europeia, JO L 435, 1-62. EUR-Lex <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/pt/all/?uri=celex:32020l2184>
- [54] Decreto-Lei n.º 236/98, de 1 de agosto de 1998 Estabelece normas, critérios e objectivos de qualidade com a finalidade de proteger o meio aquático e melhorar a qualidade das águas em função dos seus principais usos (1998). Diário da República, 3676-3722. <https://diariodarepublica.pt/dr/detalhe/decreto-lei/236-1998-430457>
- [55] Ododo, M. M. (2021). Stir Bar Sorption Extraction (SBSE) and its application for analysis of organic compounds in aqueous samples: A review. *Separations*, 13(1), 1–10. <https://doi.org/10.7176/cmr/13-1-01>
- [56] Prosen, H. (2019). Applications of hollow-fiber and related microextraction techniques for the determination of pesticides in environmental and food samples—A mini review. *Separations*, 6(4), 57. <https://doi.org/10.3390/separations6040057>
- [57] David, F., & Sandra, P. (2007). Stir bar sorptive extraction for trace analysis. *J Chromatogr. A*, 1152(1–2), 54–69. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.01.032>
- [58] Stashenko, E., & Martínez, J. R. (2014). *Advances in Gas Chromatography*. InTech. <https://doi.org/10.5772/57492>
- [59] Khan, W. A., Arain, M. B., Yamini, Y., Shah, N., Kazi, T. G., Pedersen-Bjergaard, S., & Tajik, M. (2020). Hollow fiber-based liquid phase microextraction followed by analytical instrumental techniques for quantitative analysis of heavy metal ions and pharmaceuticals. *J Pharm Anal*, 10(2), 109–122. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2019.12.003>
- [60] Ochiai, N., Sasamoto, K., David, F., & Sandra, P. (2018). Recent developments of stir bar sorptive extraction for food applications: Extension to polar solutes. *J Agric Food Chem*, 66(28), 7249–7255. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02182>
- [61] Abujaber, F., Ahmad, S. M., Neng, N. R., Rodríguez Martín-Doimeadios, R. C., Guzmán Bernardo, F. J., & Nogueira, J. M. F. (2019). Bar adsorptive microextraction coated with multi-walled carbon nanotube phases - Application for trace analysis of pharmaceuticals in environmental waters. *J Chromatogr A*, 1600, 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.04.035>
- [62] Kader, M. S., & Rahman, M. R. T. (2021). Supercritical fluid extraction (SFE), solid-phase micro extraction (SPME), and stir bar sorption extraction (SBSE) techniques. *Techniques to Measure Food Safety and Quality* (219–227). Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-68636-9\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-030-68636-9_10)
- [63] Kokosa, J. M. (2019). Selecting an extraction solvent for a greener liquid phase microextraction (LPME) mode-based analytical method. *TrAC Trends Anal Chem*, 118, 238-247. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.05.012>
- [64] Cancellier, M., Morés, L., Corazza, G., & Carasek, E. (2020). Application of bar adsorptive microextraction (BA $\mu$ E) for the determination of pesticides and emerging contaminants in water used for rice cultivation in southern Brazil. *SN Appl. Sci.*, 2(5). <https://doi.org/10.1007/s42452-020-2779-z>
- [65] Madikizela, L. M., Pakade, V. E., Ncube, S., Tutu, H., & Chimuka, L. (2020). Application of hollow fibre-liquid phase microextraction technique for isolation and pre-concentration of pharmaceuticals in water. *Membr*, 10(11), 311. <https://doi.org/10.3390/membranes10110311>

- [66] Schmeiske, C., Fernanda De Souza, D., & Gonçalves Da Silva, B. J. (2024). Optimization of the hollow fiber microextraction conditions for the determination of pesticides in whole blood by GC-MS. *Braz J Anal Chem*, 11(45), 110–121. <https://doi.org/10.30744/brjac.2179-3425.tn-10-2024>
- [67] Ide, A. H., & Nogueira, J. M. F. (2018). Hollow fiber microextraction: a new hybrid microextraction technique for trace analysis. *Anal Bioanal Chem*, 410(12), 2911–2920. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-0971-4>
- [68] Basheer, C., Suresh, V., Renu, R., & Lee, H. K. (2004). Development and application of polymer-coated hollow fiber membrane microextraction to the determination of organochlorine pesticides in water. *J Chromatogr A*, 1033(2), 213–220. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.01.050>
- [69] Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2017). *Principles of instrumental analysis* (7<sup>a</sup> ed.). Cengage Learning: Thomson Brooks.
- [70] Behniwal, P. K., & She, J. (2017). Development of HPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of metabolites of organophosphate pesticides, synthetic pyrethroids, herbicides and DEET in human urine. *Int J Environl Anal Chem*, 97(6), 548–562. <https://doi.org/10.1080/03067319.2017.1325881>
- [71] Kumaran, A., Vashishth, R., Singh, S., U, S., James, A., & Velayudhaperumal Chellam, P. (2022). Biosensors for detection of organophosphate pesticides: Current technologies and future directives. *Microchem J*, 178, 107420. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107420>
- [72] Karasek, F. W., & Clement, R. E. (1988). *Gas chromatography. Basic gas chromatography – Mass spectrometry*, 5–40. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-42760-1.50005-7>
- [73] Nascimento, R. F., Lima, A. C. A., Babosa, P. G. A., & Silva, V. P. A. (2018). *Cromatografia gasosa: Aspectos teóricos e práticos*. [Estudos da Pós-Graduação, Universidade Federal do Ceará]. Repositorio.ufc.br. <http://repositorio.ufc.br/handle/riufc/39260>
- [74] Sparkman, O. D., Penton, Z. E., & Kitson, F. G. (2011) *Gas Chromatography and Mass Spectrometry: a practical guide*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/c2009-0-17039-3>
- [75] Karasek, F. W., & Clement, R. E. (1988). *Basic Gas Chromatography – Mass Spectrometry : Gas chromatography–mass spectrometry.*, pp. 79–159. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-42760-1.50007-0>
- [76] Karasek, F. W., & Clement, R. E. (1988). *Basic Gas Chromatography – Mass Spectrometry : Mass Spectrometry*, pp. 41–77. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-42760-1.50006-9>
- [77] McNair, H. M., & Miller, J. M. (1998). *Basic gas chromatography* (2<sup>a</sup> ed). Wiley.
- [78] Serôdio, P., & Nogueira, J. M. F. (2005). Development of a stir-bar-sorptive extraction-liquid desorption-large-volume injection capillary gas chromatographic-mass spectrometric method for pyrethroid pesticides in water samples. *Anal Bioanal Chem*, 382(4), 1141–1151. <https://doi.org/10.1007/s00216-005-3210-8>
- [79] Ahmad, S. M. (2020) *Metodologias Analíticas Inovadoras Baseadas em Microextração Adsorptiva em Barra (BAμE) para a Monitorização de Contaminantes e Substâncias de Abuso Emergentes em Matrizes Ambientais e Biológicas*. [Tese de Doutoramento, Faculdade de Ciências s Universidade de Lisboa]. Repositório.ulisboa. <http://hdl.handle.net/10451/45587>

- [80] Ide, A. H., & Nogueira, J. M. F. (2018). New-generation bar adsorptive microextraction (BA $\mu$ E) devices for a better eco-user-friendly analytical approach—Application for the determination of antidepressant pharmaceuticals in biological fluids. *J Pharm Biomed Anal*, *153*, 126–134. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.02.001>
- [81] Khan, W. A., Arain, M. B., Yamini, Y., Shah, N., Kazi, T. G., Pedersen-Bjergaard, S., & Tajik, M. (2020). Hollow fiber-based liquid phase microextraction followed by analytical instrumental techniques for quantitative analysis of heavy metal ions and pharmaceuticals. *J Pharm Anal*, *10*(2), 109–122. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2019.12.003>
- [82] Abujaber, F., Ahmad, S. M., Neng, N. R., Rodríguez Martín-Doimeadios, R. C., Guzmán Bernardo, F. J., & Nogueira, J. M. F. (2019). Bar adsorptive microextraction coated with multi-walled carbon nanotube phases - Application for trace analysis of pharmaceuticals in environmental waters. *J Chromatogr A*, *1600*, 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.04.035>
- [83] Sequeiros, R. C. P., Neng, N. R., Portugal, F. C. M., Pinto, M. L., Pires, J., & Nogueira, J. M. F. (2011). Development and application of stir bar sorptive extraction with polyurethane foams for the determination of testosterone and methenolone in urine matrices. *J Chromatogr Sci*, *49*(4), 297–302. <https://doi.org/10.1093/chrsci/49.4.297>
- [84] Raynie, D. E. (2023). *Enhancing Extractions by Salting out*. LC-GC North America; UBM Medica Healthcare Publications. Retirado a 15 de dezembro de 2024 de <https://doi.org/10.56530/lcgc.na.ax9490j4>
- [85] Hyde, A. M., Zultanski, S. L., Waldman, J. H., Zhong, Y. L., Shevlin, M., & Peng, F. (2017). General principles and strategies for salting-out informed by the Hofmeister Series. *Org. Process Res. Dev.*, *21*(9), 1355–1370. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.7b00197>
- [86] Ide, A. H., & Nogueira, J. M. F. (2019). Dual-hollow fiber microextraction (dual-HF $\mu$ E) - application for monitoring trace levels of organochlorine pesticides in real matrices. *Int J Environ Anal Chem*, *100*(12), 1402–1414. <https://doi.org/10.1080/03067319.2019.1655006>
- [87] Diretiva n.º 98/83/CE, de 3 de novembro de 1998 Diretiva relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano. (1998). Conselho da União Europeia, JO L 330, 32-54. EUR-Lex. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/pt/txt/html/?uri=celex:31998l0083>
- [88] Menezes, H. C., Paulo, B. P., Paiva, M. J. N., & Cardeal, Z. L. (2016). A simple and quick method for the determination of pesticides in environmental water by HF-LPME-GC/MS. *J Anal Methods Chem*, *2016*(1). <https://doi.org/10.1155/2016/7058709>
- [89] Khalili-Zanjani, M. R., Yamini, Y., Yazdanfar, N., & Shariati, S. (2008). Extraction and determination of organophosphorus pesticides in water samples by a new liquid phase microextraction—gas chromatography—flame photometric detection. *Anal Chim Acta*, *606*(2), 202–208. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.11.032>
- [90] Sapahin, H. A., Makahleh, A., & Saad, B. (2019). Determination of organophosphorus pesticide residues in vegetables using solid phase micro-extraction coupled with gas chromatography—flame photometric detector. *Arab J Chem*, *12*(8), 1934-1944. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.12.001>
- [91] Peñalver, A., García, V., Pocurull, E., Borrull, F., & Marcé, R. M. (2003). Stir bar sorptive extraction and large volume injection gas chromatography to determine a group of endocrine disrupters in water samples. *J Chromatogr A*, *1007*(1–2), 1–9. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(03\)00933-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(03)00933-6)

- [92] Mommers, J., & van der Wal, S. (2021). Column selection and optimization for comprehensive two-dimensional gas chromatography: A review. *Crit Rev Anal Chem* 51(2), 183–202. <https://doi.org/10.1080/10408347.2019.1707643>
- [93] Krupcik, J., Garaj, J., & Guiochon, G. (1995). Calculation of the peak capacity in capillary gas chromatography. *J Chromatogr A*, 312, 1-10. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)92759-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)92759-1)
- [94] Harris, D. C. (2007). *Quantitative Chemical Analysis* (7th ed.). W. H. Freeman.
- [95] National Institute of Standards and Technology. (2025). *NIST Chemistry WebBook*. National Institute of Standards and Technology. <https://webbook.nist.gov/chemistry/>

## Anexos

### Anexo I- Cálculos e conceitos cromatográficos

#### Constante de distribuição

O equilíbrio da cromatografia pode ser facilmente compreendido através de uma equação que descreve a interação de um analito entre a fase móvel e a fase estacionária. Após injeção no GC, a amostra sofre partição na coluna, o que é expresso pelo coeficiente de distribuição ( $K$ ), uma constante de equilíbrio dependente das interações do analito com as duas fases e a temperatura [67]. A separação dos analitos ocorre mediante o seu transporte, pela fase móvel, que é por sua vez influenciado pelas diferentes interações estabelecidas entre o analito e a fase estacionária.

Assim sendo, este coeficiente permite identificar a rapidez com que se move o analito pela coluna cromatográfica, dado pela seguinte equação (Equação I.I) [67, 72]:

$$K = \frac{C_S}{C_M}$$

Equação I.I

Relaciona a concentração molar do soluto na fase estacionária ( $C_S$ ) e a concentração molar na fase movel ( $C_M$ ). O  $K$  será constante sobre uma grande variedade de concentrações de solutos, uma vez que  $C_S$  será indiretamente proporcional a  $C_M$ . Assim sendo, valores mais altos de  $K$  refletem uma maior afinidade do soluto pela fase estacionária, traduzindo-se em tempos de retenção mais longos. Por outro lado, compostos que não são retidos apresentam um  $K=0$  [72].

#### Fator de capacidade ( $k'$ )

Avalia o  $t_R$  do analito na coluna, mais propriamente na fase estacionária [72]. Esta equação (Equação I.II) permite relacionar o tempo em que o analito esteve na fase estacionária e na fase móvel.

$$k' = \frac{t_{R'}}{t_M} = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

Equação I.II

Nesta equação,  $t_R$  é referente ao  $t_R$  do analito enquanto  $t_M$  é o tempo morto ou tempo de retenção do composto não retido, que representa o tempo mínimo para cada composto, que não interaja com a fase estacionária, atravesse a coluna [77].

Para entender melhor estes conceitos, considere uma mistura contendo dois analitos, A e B. Após a injeção da amostra no sistema, cada composto interagirá de forma distinta com a fase estacionária, resultando em tempos de retenção diferentes,  $t_{RA}$  e  $t_{RB}$ . Antes do aparecimento desses picos no cromatograma, observa-se o  $t_M$ , que representa o tempo necessário para a fase móvel atravessar a coluna sem interagir com a fase estacionária. O tempo gasto pela interação do analito com a fase estacionária é

definido como tempo de retenção ajustado ( $t_R'$ ), e é obtido subtraindo do  $t_M$  ao respectivo  $t_R$ . Podemos visualizar esta explicação na seguinte Figura I.I [92].

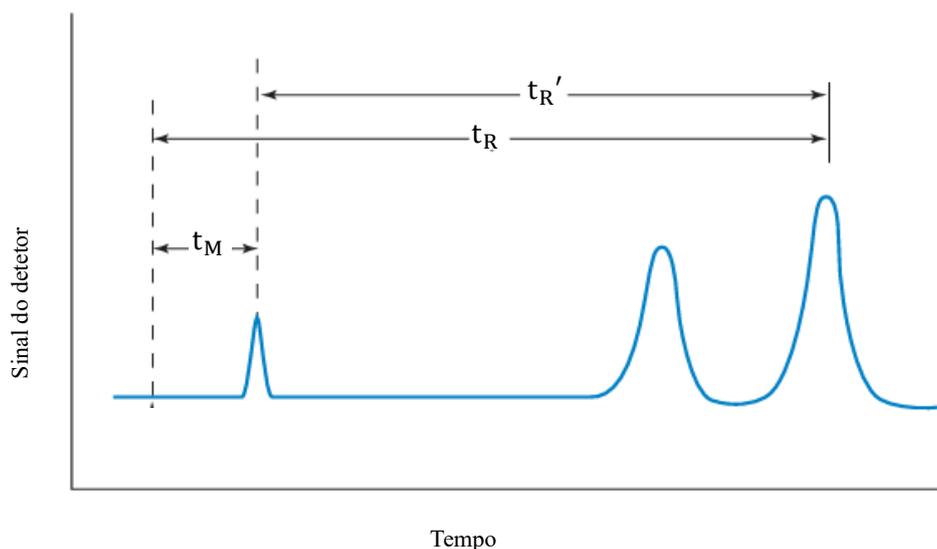


Figura I.I- Ilustração da separação de dois analitos por GC-MS. Retirado de [90].

### Seletividade

A seletividade da fase estacionária com a amostra, ou seja, a separação dos analitos pode ser determinada pela seletividade ( $\alpha$ ) apresentando sempre um valor superior a 1. Esta grandeza pode ser definida pela seguinte equação (Equação I.III) [67]:

$$\alpha = \frac{K'_B}{K'_A}$$

Equação I.III

Onde  $K'_B$  representa a constante de distribuição do composto mais fortemente retido (B), e  $K'_A$  do composto mais rapidamente eluído (A). Quanto maior o valor de  $\alpha$ , maior será a seletividade da fase estacionária, resultando numa melhor separação. Valores de  $\alpha$  próximos a 1, indicam que os analitos possuem solubilidades semelhantes, dificultando a sua separação [72].

### Eficiência da coluna

A eficiência de uma coluna cromatográfica está associada à altura de um prato teórico ( $H$ ) e ao número de pratos teóricos ( $N$ ), sendo estas grandezas relacionadas pelo comprimento da coluna ( $L$ ) (Equação I.IV) [67, 74, 93].

$$N = \frac{L}{H}$$

Equação I.IV

Cada prato teórico representa uma etapa de equilíbrio do analito entre as duas fases. Assim sendo, a eficiência de separação da coluna é maior (picos mais estreitos) quanto maior for o  $N$  e menor for  $H$ . Esta eficiência é influenciada por variáveis como o tipo de coluna, bem como as propriedades da fase estacionária e da fase móvel [72, 94].

Em sistemas cromatográficos com picos simétricos que seguem uma distribuição gaussiana, a eficiência cromatográfica pode ser estudada através do  $N$  atendendo à seguinte equação (Equação I.V) [76]:

$$N = 16 \times \left( \frac{t_R}{W} \right)^2$$

Equação I.V

Onde  $W$  corresponde à largura da base do pico [91].

### Resolução

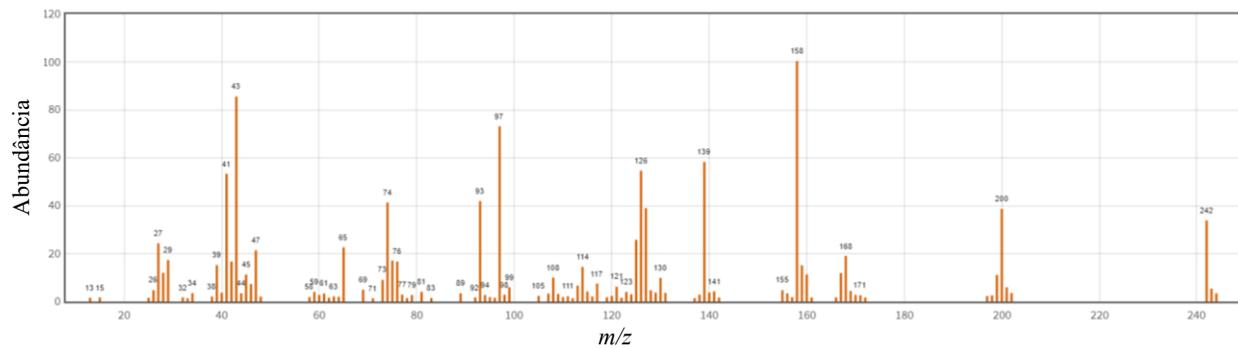
Sendo a cromatografia uma técnica utilizada para separação dos constituintes de uma mistura, é possível avaliar a eficiência separação da coluna entre dois picos adjacentes por meio da resolução ( $R_s$ ) expressa pela seguinte equação (Equação I.VI) [67, 72, 76]:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \times \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \times \left( \frac{k_B}{k_B + 1} \right)$$

Equação I.VI

Podemos observar a relação entre o fator de separação de dois solutos ( $\alpha$ ), o número de pratos teóricos ( $N$ ) que formam a coluna e a resolução ( $R_s$ ). Quanto maior a resolução, maior a separação dos picos, sendo um valor de  $R \geq 1,5$  definido como uma separação ideal [73, 76]. Nesta equação,  $\frac{\sqrt{N}}{4}$  representa a eficiência da coluna,  $\frac{k_B}{k_B+1}$  está associado à retenção, e  $\frac{\alpha-1}{\alpha}$  reflete a seletividade [72].

Anexos II- Espectros de massa característicos dos OPs em estudo; retirado do *NIST* [95].



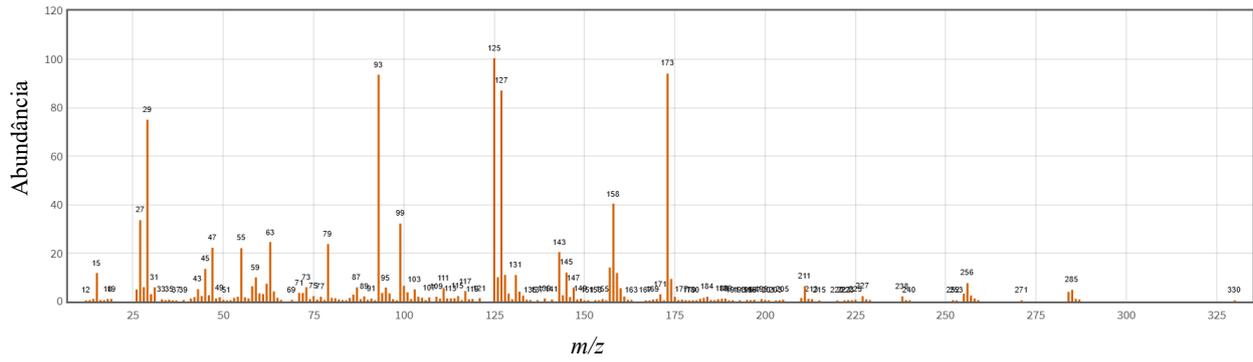


Figura II.IV- Espectro de massa característico do malatião.

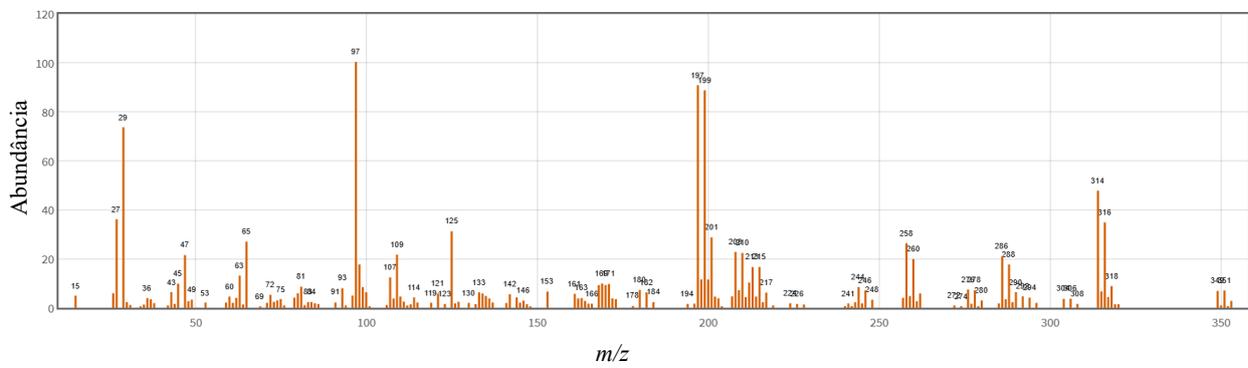


Figura II.V- Espectro de massa característico do clorpirifos.

Anexo III- Cromatogramas obtidos aplicando o método HF $\mu$ E-  $\mu$ LD/LVI-GC-MS a matrizes reais.

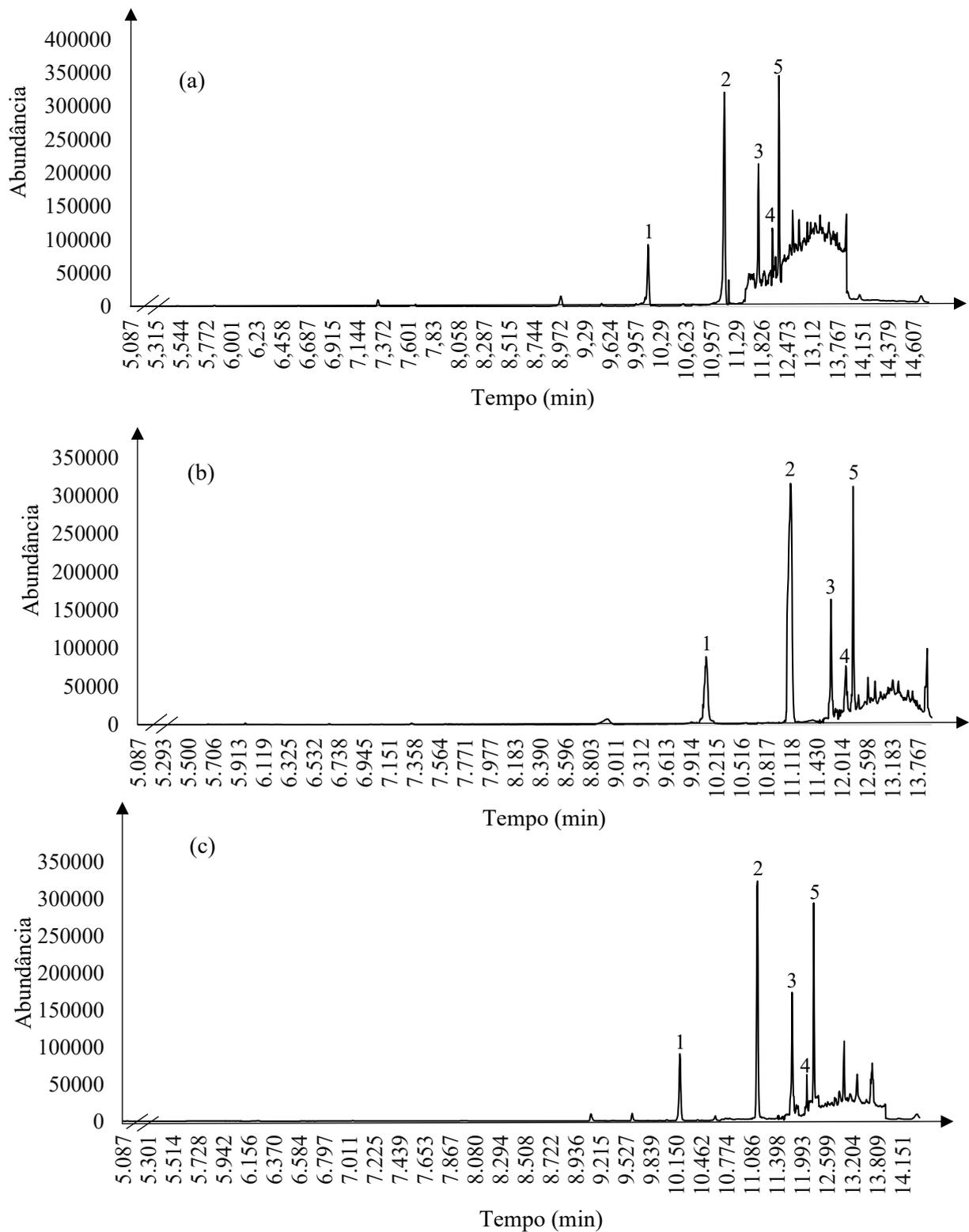


Figura III.I- Cromatogramas obtidos por dual-HF $\mu$ E(*n*-C<sub>8</sub>:Tol)- $\mu$ LD/LVI-GC-MS(SIM), das amostras da água de torneira (a), de estuário (b) e da ETAR (c) fortificadas com 2,5 mg/L, nas condições experimentais otimizadas. 1. Etoprofos, 2. Diazônio, 3. Metil-paratião, 4. Malatião, 5. Clorpirifos.